

---

# Masterarbeit

---

Frau

**Stefanie Urbanek**

Funktionelle Beschichtung von Titanoberflächen  
mit Kalziumphosphatphasen unter Einbeziehung  
biologisch aktiver Spurenelemente

Mittweida, 2016

Fakultät Angewandte Computer- und  
Biowissenschaften

---

**Masterarbeit**

---

Funktionelle Beschichtung von Titanoberflächen  
mit Kalziumphosphatphasen unter Einbeziehung  
biologisch aktiver Spurenelemente

Autor:  
**Frau**

**Stefanie Urbanek**

Studiengang:  
**Molekularbiologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**MO14w1-M**

Erstprüfer:  
**Frau Prof. Dr. Petra Radehaus**

Zweitprüfer:  
**Frau Dr. Cornelia Wolf-Brandstetter**

Einreichung:  
**Mittweida, 2016**

## **Bibliographische Beschreibung:**

Urbanek, Stefanie: Funktionelle Beschichtung von Titanoberflächen mit Kalziumphosphatphasen unter Einbeziehung biologisch aktiver Spurenelemente. 2016. 10 Seiten, 77 Seiten, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer-und Biowissenschaften, Anfertigung der Arbeit am Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, Technische Universität Dresden, Masterarbeit, 2016

## **Englischer Titel:**

Functional coating of titanium surface with calcium phosphate phases, including biologically active trace elements.

## **Kurzbeschreibung:**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Modifizierung von Titanoberflächen mit Kalziumphosphatbeschichtungen unter Einbeziehung der biologisch aktiven Spurenelemente Strontium und Kupfer untersucht. Hierfür bildet die Methode der elektrochemisch gestützten Abscheidung (ECAD) von Kalziumphosphaten aus wässrigen Elektrolyten die Grundlage. Mit der Modifizierung der Kalziumphosphatbeschichtung soll die Einheilphase der Implantate verkürzt werden, indem durch sukzessive Degradation sowie der Phasenumwandlung der unter Bruchitbedingung abgeschiedenen Beschichtungszustände die immobilisierten Ionen in das Umgebungsgewebe freigesetzt werden.

Für die Bruchitabscheidung mit bzw. ohne Strontium wurden drei unterschiedliche Beschichtungsstrategien zur Immobilisierung von Kupfer in die Kalziumphosphatbeschichtung angewendet. Diese spurenelementhaltigen Beschichtungen wurden hinsichtlich der Belegungsdichten der Hauptkomponenten der Kalziumphosphatmatrix sowie der eingelagerten Spurenelemente sowie der Morphologie der Beschichtungsoberfläche untersucht. Zur weiteren Oberflächencharakterisierung wurden der chemische Status von Kupfer und Strontium sowie die Phasenzusammensetzung der abgeschiedenen Beschichtung analysiert. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit unterschiedliche Belegungsdichten bzw. die verschiedenen Beschichtungsvarianten das Freisetzungsverhalten der Spurenelemente unter annähernd physiologischen Verhältnissen beeinflusst. Die kupferhaltigen Beschichtungszustände wurden hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials untersucht.



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	iv
Tabellenverzeichnis .....	vi
Abkürzungsverzeichnis .....	vii
1 Einleitung .....	1
1.1 Kalziumphosphat - Phasen .....	2
1.2 Biologisch aktives Spurenelement Strontium .....	5
1.3 Biologisch aktives Spurenelement Kupfer .....	6
1.4 Elektrochemisch gestützte Abscheidung .....	8
2 Zielstellung .....	10
3 Material .....	11
4 Methoden .....	14
4.1 Vorbereitung der Titanoberfläche .....	14
4.2 Elektrochemische Versuchsanordnung .....	14
4.3 Beschichtung der Titanoberfläche .....	15
4.3.1 Herstellung einer Strontium-modifizierten Titanoberfläche .....	15
4.3.2 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch Zugabe von Kupfer im Elektrolyten .....	16
4.3.3 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch elektrochemische Abscheidung einer Kupferbasisschicht .....	16
4.3.4 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch Proben-einlagerung in Kupferbad .....	17
4.3.5 Nachbehandlung einiger Beschichtungszustände mit Natriumhydroxid .....	17
4.4 Probensterilisierung .....	18
4.5 Freisetzungsstudie .....	18
4.6 Probenanalytik .....	18
4.6.1 Rasterelektronenmikroskopie .....	18
4.6.2 Bestimmung der Konzentrationen an Kalzium, Phosphat und Kupfer mittels fotometrischen Farbttests .....	19
4.6.3 Bestimmung der Konzentration an Strontium mit Atomabsorptions- spektroskopie .....	19
4.6.4 Röntgenphotoelektronenspektroskopie .....	19

4.6.5 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie .....	20
4.7 Bakterienadhäsion an spurenelementhaltigen Beschichtungen.....	20
4.8 Allgemeine Angaben zum Versuchsdesign und Probenzahlen.....	22
5 Ergebnisse.....	23
5.1 Charakterisierung der unterschiedlich beschichteten Titanoberflächen .....	24
5.1.1 Belegungsdichten der Hauptkomponenten der unterschiedlichen Beschichtungszustände .....	24
5.1.2 Molare $\text{Ca}/\text{PO}_4^{3-}$ -, $(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{PO}_4^{3-}$ -, sowie $(\text{Ca}+\text{Cu})/\text{PO}_4^{3-}$ - Verhältnisse der Beschichtung nach Abscheidung.....	27
5.1.3 Phasenzusammensetzung der Beschichtungszustände .....	29
5.1.4 Chemischer Status der Elemente sowie relative Quantifizierung der Elemente in der Beschichtungsoberfläche .....	31
5.2 Freisetungsverhalten der abgeschiedenen Beschichtungen bei Inkubation in simulierter Körperflüssigkeit .....	33
5.2.1 Belegungsdichte an Kalzium -, Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation.....	33
5.2.2 Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen in der Inkubationslösung.....	38
5.2.3 Molare $\text{Ca}/\text{PO}_4^{3-}$ -Verhältnisse nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	43
5.2.4 Morphologie von CPP-Beschichtung nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation.....	45
5.3 Einfluss der Belegungsdichten an Kupfer und Strontium sowie CPP auf Bakterienadhäsion an Beschichtungsoberflächen.....	52
5.3.1 Fluoreszenzmikroskopie von CPP-Beschichtungen nach Besiedlung mit <i>E.coli</i> SM 2029.....	52
5.3.2 Beurteilung der Bakterienviabilität .....	55
6 Diskussion der Ergebnisse .....	56
6.1 Zusammensetzung und CPP nach elektrochemischer Abscheidung. 56	
6.1.1 Vergleich der Belegungsdichten an Kupfer- und Strontiumionen in Abhängigkeit der Immobilisierungsmethode des Kupfers.....	56
6.1.2 Vergleich der Belegungsdichten an Kalzium und Phosphat sowie CPP in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode der Kupferionen .....	60

6.1.3 Auswirkungen der anschließenden NaOH-Behandlung der Beschichtungen auf die Belegungsdichten und CPP .....	65
6.2 Verhalten der abgeschiedenen CPP in dem serumhaltigen Medium TAS-SBF während der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	66
6.3 Antimikrobieller Effekt von Kupfer auf <i>E.coli</i> SM 2029.....	70
6.4 Fehleranfälligkeit der Messmethoden .....	71
7 Zusammenfassung und Ausblick .....	73
8 Summary and Outlook .....	75
Anhang .....	77
Anhang 1 Freisetzungsverhalten für Co-Abscheidung Brushit + 0,3 mM Cu, 1,5 mA/cm <sup>2</sup> , 3200 s ohne/mit NaOH-Behandlung .....	77
Anhang 2 Voruntersuchungen der Beschichtungszustände mit Kupferbasisschicht .....	77
Anhang 3 Freigesetzte Kupfer- und Strontiummenge im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	78
Anhang 4 Molare Ca/P - Verhältnisse der Beschichtungszustände nach dreitägiger Inkubation in serumhaltiger SBF .....	80
Anhang 5 Prozentual von Bakterien belegte Fläche mit einer Zellzahl von 10 <sup>5</sup> Zellen/ml .....	81
Anhang 6 Untersuchung mittels Röntgendiffraktion.....	82
Literaturverzeichnis.....	84
Danksagung .....	89
Selbstständigkeitserklärung .....	90

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Löslichkeit von ausgewählten CPP in Abhängigkeit des pH-Werts ....	4
Abbildung 2	Kristallstruktur von Brushit .....	5
Abbildung 3	Wirkmechanismen von Strontium auf Knochenzellen.....	6
Abbildung 4	Antibakterielles Potential des Kupfers .....	8
Abbildung 5	Schema des Messprinzips der elektrochemisch gestützten Abscheidung von Kalziumphosphaten .....	9
Abbildung 6	Versuchsanordnung der elektrochemisch gestützten Abscheidung..	14
Abbildung 7	Belegungsdichten an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer-, Strontiumionen nach Abscheidung von CPP-Beschichtungen auf Titanoberflächen .	27
Abbildung 8	FTIR-Spektren der Referenzzustände Brushit, Hydroxylapatit und Monetit.....	29
Abbildung 9	IR-Spektren der spurenelementhaltigen CPP .....	30
Abbildung 10	XPS-Spektren der Cu 2p Region am Beispiel der sCPP mit und ohne NaOH-Bad .....	31
Abbildung 11	XPS-Spektren der C 1s und Sr 3p Region am Beispiel der sCPP-Beschichtungen mit und ohne NaOH-Bad.....	32
Abbildung 12	Belegungsdichten an Kalzium -,Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Inkubation von Brushit sowie CPP-Beschichtung mit Kupferzugabe im Elektrolyten im serumhaltigen Medium .....	34
Abbildung 13	Belegungsdichten an Kalzium -,Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Inkubation im serumhaltigen Medium der CPP-Beschichtung auf Kupferbasisschicht.....	36
Abbildung 14	Belegungsdichten an Kalzium- Phosphat-, Kupfer-, Strontium und nach Abscheidung und nach Inkubation der CPP mit nachträglicher Kupferbadbehandlung .....	38
Abbildung 15	Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen im serumhaltigen Inkubationsmedium von Brushit und CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten .....	39
Abbildung 16	Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und	



	Strontiumionen im serumhaltigen Medium der CPP auf Kupferbasisschicht.....	41
Abbildung 17	Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen im serumhaltigen Inkubationsmedium der in Kupferbad ausgelagerten Proben.....	43
Abbildung 18	Fluoreszenzmikroskopie der mit GFP-gelabelten <i>E.coli</i> SM 2029 belegten Beschichtungsoberfläche.....	53
Abbildung 19	Prozentual bedeckte Fläche der Beschichtungsoberflächen mit <i>E.coli</i> SM 2029 nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium, Mittelwert von je 2 Proben pro Zustand und 15 Aufnahmen pro Probe .....	54
Abbildung 20	Bestimmung der optischen Dichten bei 600 nm der abgenommenen Bakteriensuspension nach 17-stündiger Inkubation der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände.....	54
Abbildung 21	Live/Dead-Färbung der adhärenenten Bakterien an den spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen nach 17-stündiger Inkubation dieser Proben im Biofilmmedium.....	55
Abbildung 22	Freisetzungsverhalten des Probenzustandes Coabscheidung Brushit mit 0,3 mM Kupfer .....	77
Abbildung 23	Belegungsdichten an Kupfer in der Kupferbasisschicht in Abhängigkeit von Abscheidungsdauer, Stromdichte, Konzentration der Kupfersulfatlösung sowie Drehzahl der Schüttelplatte.....	77
Abbildung 24	Prozentual bedeckte Fläche der Beschichtungsoberflächen mit <i>E.coli</i> SM 2029 nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium nach Inokulation von $2 \cdot 10^5$ Zellen .....	82
Abbildung 25	Diffraktogramm von Co-Abscheidung Brushit mit 20 mM Sr .....	82
Abbildung 26	Diffraktogramm von Co-Abscheidung Brushit mit 20 mM Sr sowie 0,5 mM Cu .....	83

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Zusammensetzung verschiedener Kalziumorthophosphate .....	2
Tabelle 2	Chemikalien und deren Herkunft .....	11
Tabelle 3	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung .....	12
Tabelle 4	Konzentrationen an Kalzium, Phosphat und Strontium im Elektrolyten .....	16
Tabelle 5	Parameterset der elektrochemischen Abscheidung einer Kupferbasisschicht auf Titanoberfläche .....	17
Tabelle 6	Molare Ca/P -, (Ca+Cu)/P - sowie (Ca+Sr)/P - Verhältnisse nach Abscheidung .....	28
Tabelle 7	Molare Ca/P-Verhältnisse nach Abscheidung und nach Inkubation	44
Tabelle 8	REM-Aufnahmen von den Oberflächen der Beschichtungen Bruschitreferenz sowie der CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	46
Tabelle 9	REM-Aufnahmen von den Oberflächen der CPP auf Kupferbasis- schicht nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	48
Tabelle 10	REM-Aufnahmen von den Oberflächen der Beschichtungen mit adsorbiertem Kupfer nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium .....	50
Tabelle 11	Literaturwerte für Peakpositionen von Cu 2p <sub>3/2</sub> .....	59
Tabelle 12	Literaturwerte für Peakpositionen von Sr 2p <sub>3/2</sub> .....	60
Tabelle 13	Freisetzungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Kupfers .....	78
Tabelle 14	Freisetzungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Strontiums .....	79
Tabelle 15	Molare Ca/P-Verhältnisse nach Inkubation in serumhaltiger SBF ...	80

**Abkürzungsverzeichnis**

Atom%	Atomprozent
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ACP	Amorphes Kalziumphosphat
Bru	Bruschit
Bru/20 mM Sr	Co-Abscheidung Bruschit und 20 mM Strontium
CaP	Kalziumphosphate
CPP	Kalziumphosphat-Phase
DCPD	Dikalziumhydrogenphosphat - Dihydrat (Bruschit)
DPCA	Dikalziumhydrogenphosphat (Monetit)
ECAD	electrochemically assisted deposition, dt. elektrochemisch gestützte Abscheidung
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
eV	Elektronenvolt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
kGy	kilogray
HAP	Hydroxylapatit
OCP	Oktakalziumphosphat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
REM	Rasterelektronenmikroskopie

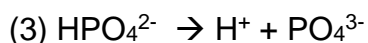
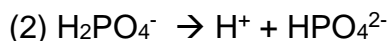
rpm	revolutions per minute, dt. Umdrehungen pro Minute
SBF	simulated body fluid, dt. simulierte Körperflüssigkeit
sCPP	spurenelementhaltige Kalziumphosphatphasen
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy, dt. Röntgenphotoelektronen-spektroskopie
XRD	X-ray diffraction, dt. Röntgendiffraktion

## 1 Einleitung

Titan - basierte Materialien werden häufig als Biomaterialien für die Implantation in das Weichgewebe als auch im Knochengewebe eingesetzt. Diese Materialien zeichnen sich durch ihre mechanisch günstigen Eigenschaften sowie das hervorragende Korrosionsverhalten aus. Unter besonderen Bedingungen kann die Implantation in das Knochengewebe gestört ablaufen, sodass in Folge eine aseptische Lockerung mit einem möglichen Implantatversagen auftreten kann. Um eine langfristige stabile Verankerung eines Biomaterials im Knochengewebe zu erzielen, muss die initiale Einheilphase des Implantats direkt im Anschluss der Implantation mit verschiedenen Strategien optimiert werden. Mittels funktioneller Oberflächenbeschichtung kann unterstützend auf diesen osseointegrativen Prozess eingewirkt werden. Diese Oberflächenbeschichtung kann aus kalziumphosphatbasierten Materialien wie zum Beispiel Hydroxylapatit oder Brushit bestehen. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit dieser Kalziumphosphate zum natürlichen Knochenmineral stellt diese Beschichtungsart eine im klinischen Einsatz etablierte Methode zur unterstützenden Integration des Implantats im Knochen dar. Besonders bei Patienten mit schlechtem Knochenlager sowie bei systemischen Erkrankungen wie Osteoporose und Diabetes mellitus ist eine verbesserte Osseointegration von immenser Bedeutung. Mit der elektrochemisch gestützten Abscheidung von Kalziumphosphaten aus wässrigen Elektrolyten können komplex strukturierte Materialoberflächen mit dichten keramischen Beschichtungen überzogen werden. Durch Elektrolytmodifikationen können die biologisch aktiven Metallionen in diese keramischen Beschichtungen integriert werden. Das Kupfer ist essentielles Spurenelement, welches bei der Angiogenese und der Neubildung von Knochengewebe eine große Bedeutung zugeschrieben wird. Weiterhin besitzt Kupfer ein antimikrobielles Potenzial, welches bei der Vorbeugung von Infektionen eine wichtige Rolle spielt. Strontium fördert die Bildung von Knochengewebe bei gleichzeitiger Suppression der Knochenresorption. Aufgrund der sukzessiven Degradationen bzw. der Phasenumwandlung des leicht löslichen Brushit *in vivo* können in die Beschichtung integrierte Ionen am Implantatort freigesetzt und demzufolge der Einheilprozess des Implantats unterstützt werden (Peters und König (2008); Noyama et al. (2012); Wazen et al. (2013); Matusiewicz (2014)).

### 1.1 Kalziumphosphat - Phasen

Von der Orthophosphorsäure  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , eine dreiprotonige und mittelstarke Säure, leiten sich die Kalziumphosphate (CaP) ab. Die Dissoziation der Orthophosphorsäure erfolgt unter Abspaltung von Wasserstoff in drei Schritten:



Dihydrogenphosphate (primäre Phosphate), Hydrogenphosphate (sekundäre Phosphate) und Phosphate (tertiäre Phosphate) können mit Kalzium zu verschiedenen Kalziumphosphatverbindungen reagieren. Tabelle 1 fasst die wichtigsten Kalziumphosphat - Phasen (CPP) mit ihren zunehmenden molaren Kalzium zu Phosphat - Verhältnissen und ihrer Löslichkeit in wässrigen Lösungen zusammen. Kennzeichen der CaP ist die allgemeine Formel  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ , das heißt es liegt ein Dreistoffsystem vor (Krönung (2008)). Anhand der Kalzium zu Phosphat - Verhältnisse von 1 bis 2 ist eine Einteilung der CaP im Sinne einer stöchiometrischen Zusammensetzung möglich. Es gilt der Grundsatz, dass ein kleines Kalzium zu Phosphat - Verhältnis mit einer besseren Löslichkeit in wässrigen Lösungen und hoher Azidität korreliert.

**Tabelle 1    Zusammensetzung verschiedener Kalziumorthophosphate (Schumacher (2014))**

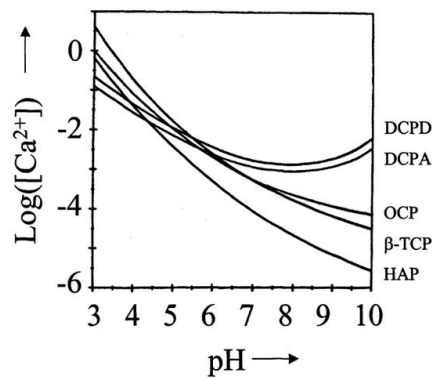
Summenformel der CPP	Trivialname Kristallsystem	Molares Ca/P- Verhältnis	lg Löslich- keits- produkt bei 25 °C	pH - Stabilitäts- bereich bei 25 °C
$\text{CaHPO}_4$	Monetit (Dikalziumhydrogen- phosphat - DPCA)  Triklin	1	6,9	-

**Tabelle 1 (Fortsetzung) Zusammensetzung verschiedener Kalziumorthophosphate  
(Schumacher (2015); Epple (2013))**

Summenformel der CPP	Trivialname Kristallsystem	Molares Ca/P- Verhältnis	Ig Löslich- keits- produkt bei 25 °C	pH - Stabilitäts- bereich bei 25 °C
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Bruskit (Dikalziumhydrogen- phosphat-Dihydrat - DCPD)  Monoklin	1	6,59	2,0-6,0
$\text{CaHPO}_4$	Oktakalziumphosphat  (OCP)  Triklin	1,33	96,9	5,5-7,0
$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (n=3-4,5)  (15-20 % $\text{H}_2\text{O}$ )	Amorphes Kalziumphosphat  (ACP)	1,0 - 2,2 <sup>1</sup>	-	~ 5-12  (meta- stabil)
$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$	Hydroxylapatit  (HAP)  Hexagonal	1,67	58,4	9,5-12

Die Kalziumphosphate weisen eine pH - Wert abhängige Löslichkeit auf (Abbildung 1). In dem Diagramm ist der Logarithmus der Gesamt-Kalziumkonzentration gegen den pH - Wert bei 25 °C aufgetragen (Krönung (2008); Epple (2003)).

<sup>1</sup> Chemische Zusammensetzung ist abhängig von den Fällungsbedingungen (pH-Wert, Konzentrationen an Kalzium und Phosphat)

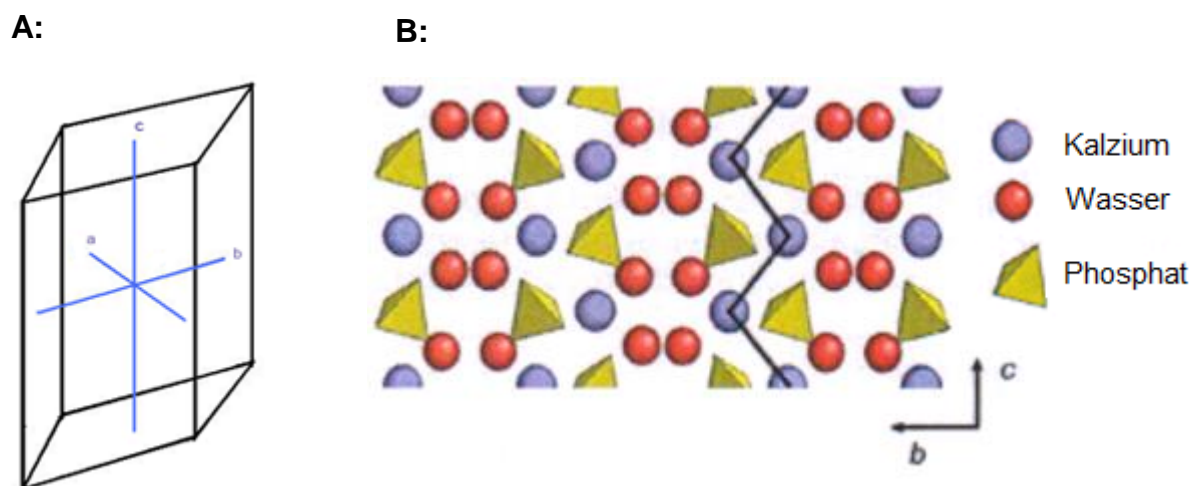


**Abbildung 1**      **Löslichkeit von ausgewählten CPP in Abhängigkeit des pH-Werts**  
(Epple M. (2003))

In dieser Forschungsarbeit liegt der Schwerpunkt auf der CPP Bruschit. Aufgrund des hohen Löslichkeitsproduktes von Bruschit im physiologischen Medium ist von einer sukzessiven Degradation bzw. Phasenumwandlung auszugehen (Sheik et al. (2015); Klammert et al. (2011)). Durch Lösungs- und Präzipitationsprozesse kann Bruschit in Lösungen mit pH - Werten zwischen 6-7 in Oktakalziumphosphat (OCP) bzw. bei pH - Werten größer 7 in Hydroxylapatit (HAP) umgewandelt werden (Krönung (2008); Epple (2003)). Mit der Integration von biologisch aktiven Spurenelementen in diese Bruschitbeschichtung kann eine gezielte Freisetzung dieser immobilisierten Ionen am Implantatort erzielt werden, sodass die Osseointegration des Implantats in den Knochen unterstützt wird. Weiterhin zeichnet sich Bruschit wie andere CPP durch eine hervorragende Biokompatibilität aus, die auf der chemischen Ähnlichkeit zur natürlichen Knochenmatrix beruht.

Bruschit oder Dikalziumhydrogenphosphat - Dihydrat (DCPD) mit der Formel  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  kristallisiert leicht aus wässrigen Lösungen monoklin in einem Schichtgitter (Abb. 2, A). Zwischen den Kalziumphosphatketten, die im Kristall parallel nebeneinander liegen, ist das Kristallwasser eingelagert. Jeweils ein Phosphation ist zwischen den Kalziumionen angeordnet. Im Kristallgitter des Bruschits ist jeweils ein Kalziumion mit sechs Phosphataten und zwei Wasserstoffatomen koordiniert (Abb. 2, B) (Peters (2001)).





**Abbildung 2 Kristallstruktur von Brushit**

**A:** Monoklines Kristallsystem. Die Achsen a, b und c besitzen unterschiedliche Längen. Eine Achse ist zu den beiden senkrecht stehenden Achsen geneigt. **B:** Struktur von Brushit entlang der a-Achse.

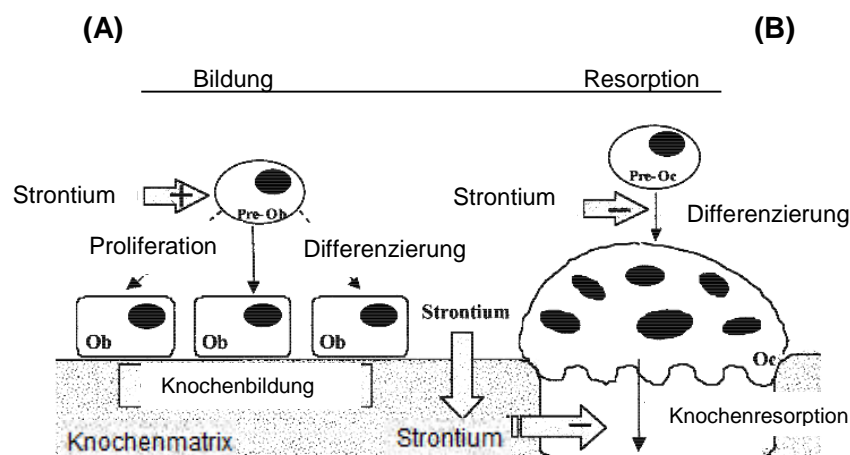
(Boanini et al. (2009); URL-1)

## 1.2 Biologisch aktives Spurenelement Strontium

Erst Mitte der 1990er Jahre wurde in zahlreichen klinischen Studien der Effekt von Strontium auf das Knochengewebe *in vivo* untersucht. Eine regelmäßige Aufnahme von zweiwertigem Strontium von 2 g pro Tag führte zur signifikanten Zunahme der Knochendichte und zur Abnahme von osteoporose - assoziierten Frakturen. Bei dem hieraus entwickelten Osteoporosemedikament Strontiumranelat sind die mit Ranelinsäure komplexierten zweiwertigen Strontiumionen, die in wässrigen Lösungen als freie Ionen vorliegen, die pharmazeutisch wirksamen Bestandteile. Die Wirksamkeit dieses Medikamentes beruht darauf, dass Strontium einen ähnlichen Ionenradius sowie dieselbe Ladung wie Kalzium besitzt und demzufolge im Körper die biologischen Prozesse des Kalziums folgen kann. Beispielsweise kann Strontium an den Kalziumbindungsplätze in den Knochenapatiten eingebaut werden (Schumacher (2015); Nielsen (2004)).

Die Zunahme der Knochendichte sowie die Abnahme von osteoporose - assoziierten Frakturen kann mit der Wirkung des Strontiums auf zellulärer Ebene erklärt werden, indem diese die Knochenbildung unterstützen und die Knochenresorption supprimieren (Abbildung 3). Erzielt wird die Unterstützung der Knochenbildung durch die stimulierte Proliferation der Präosteoblasten und einer erhöhten Synthese der Expression kollagener Matrixproteine. Bisher sind die genauen Mechanismen der biologischen Wirksamkeit der Strontiumionen auf sowohl Osteoblasten wie

Osteoklasten noch nicht verstanden. Jedoch weisen Ergebnisse von Studien darauf hin, dass Strontium *in vivo* die Expression von  $\beta$  - Catenin erhöht. Dies deutet auf eine Verstärkung der Transkriptionsfaktoren der Osteogenese hin (Schumacher, (2015)). Weiterhin steigert Strontium die Prostaglandin-Expression, dass stimulierend auf die Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Vorläuferzellen wirkt (Choudhary et al. (2007)). Die Ergebnisse diverser Studien zeigen, dass Strontium-ionen den durch Kalzium aktivierenden calcium sensing receptor (CaSR) aktivieren können, sodass eine Regulierung der Aktivität der Osteoblasten sowie der osteogenen Differenzierung möglich ist (Marie (2010)). Die Knochenresorption wird eingeschränkt, indem freigesetzte Strontiumionen auf der Knochenoberfläche die Differenzierung und die Aktivität der Osteoklasten inhibieren ohne ersichtliche zytotoxische Effekte auf Osteoblasten und Osteoklasten auszulösen (Schumacher (2015)).



**Abbildung 3 Wirkmechanismen von Strontium auf Knochenzellen**

**A:** Stimulation der Replikation von Präosteoblasten und erhöhte Synthese der Matrix.

**B:** Inhibition der Differenzierung sowie der Aktivität von Osteoblasten.

(Abkürzungen: Pre-Ob: Präosteoblasten, Ob: Osteoblast, Pre-Oc: Präosteoklasten, Oc: Osteoklast; + Stimulation, - Inhibition)

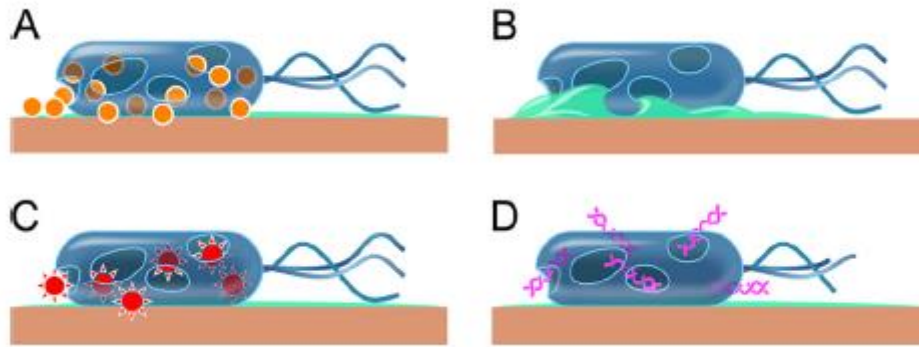
(Modifiziert nach Marie J.P. et al. (2001))

### 1.3 Biologisch aktives Spurenelement Kupfer

Zum optimalen Einwachsen eines Implantats in den Knochen ist eine funktionale Blutgefäßneubildung (Angiogenese) eine wichtige Voraussetzung. Unter dem Prozess der Angiogenese ist die Aussprossung neuer Blutgefäße aus dem bereits vorhandenen Blutgefäßsystem zu verstehen. Im Zusammenhang mit dem angiogenen Wirkpotential spielt das essentielle Spurenelement Kupfer eine große

Rolle. Der zugrunde liegende biologische Mechanismus des Kupfers im Prozess der Angiogenese ist noch nicht vollständig verstanden. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang die Enzymgruppe der Superoxiddismutase identifiziert, deren katalytisches Zentrum Kupfer- und Zinkionen enthält. Kupfer dient in verschiedenen Enzymen als katalytisch wirksames Metallkation. Weiterhin kann Kupfer als Bestandteil der Lysyl - Oxidase, welches die Quervernetzung von Elastin und Kollagen katalysiert, die Knochenbildung beeinflussen (Wu et al. (2003); Bose et al. (2013)).

Weiterhin besitzt Kupfer ein antimikrobielles Potential. Prinzipiell kann eine Kontamination eines Implantats mit Mikroorganismen bereits perioperativ stattfinden. Diese implantat - assoziierten Infektionen und die damit einhergehende Biofilmbildung können durch antimikrobielle Oberflächenmodifikationen verhindert werden. Nach Kontakt der Bakterien mit zweiwertigen Kupferionen laufen vier Mechanismen ab (Abbildung 4). Durch freigesetzte Kupferionen aus der Beschichtungsoberfläche eines Implantats werden Zellschäden am Bakterium verursacht (Abb.4, A), die zur Ruptur der Zellmembran führen und im Ergebnis zum Verlust des Membranpotentials und des Zellplasmas (Abb.4, B). Durch die anschließende kupferinduzierte Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies wird der Prozess der Zellschädigung fortgesetzt (Abb.4, C) und letztendlich die genomische sowie die Plasmid - DNA abgebaut (Abb.4, D) (Grass et al. (2011)). Weiterhin verändert Kupfer die Proteinstruktur oder stört die Struktur und Funktion der Enzyme durch Bindung an schwefel-oder karboxylathaltigen Gruppen (Liu et al. (2014); Thurman et al. (1989); Sterritt et al. (1980)). In Bakterien haben sich einige Mechanismen entwickelt, die diese vor der toxischen Wirkung von Kupfer schützen: extrazelluläre Sequestrierung der Kupferionen, aktive Extrusion von Kupfer aus der Zelle sowie kupferbindende Metallothioneine. *Escherichia coli* besitzt zur Verteidigung gegen das toxisch wirksame Kupfer mehrere spezifische zelluläre Resistenzsysteme (CopA, CusF sowie CueO), sodass minimale Kupfermengen toleriert (Grass et al. (2011)).



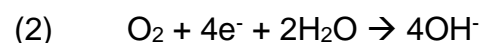
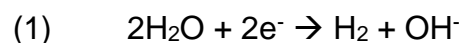
**Abbildung 4 Antibakterielles Potential des Kupfers**

**A:** Kuper löst sich aus der Oberfläche und verursacht Zellschäden. **B:** Zellmembran bricht auf und führt zum Verlust des Membranpotentials sowie des zytoplasmatischen Inhalts. **C:** Weitere Zellschäden durch Generierung radioaktiver Sauerstoffspezien. **D:** Abbau der genomischen und Plasmid-DNA.

(Grass et al. (2011))

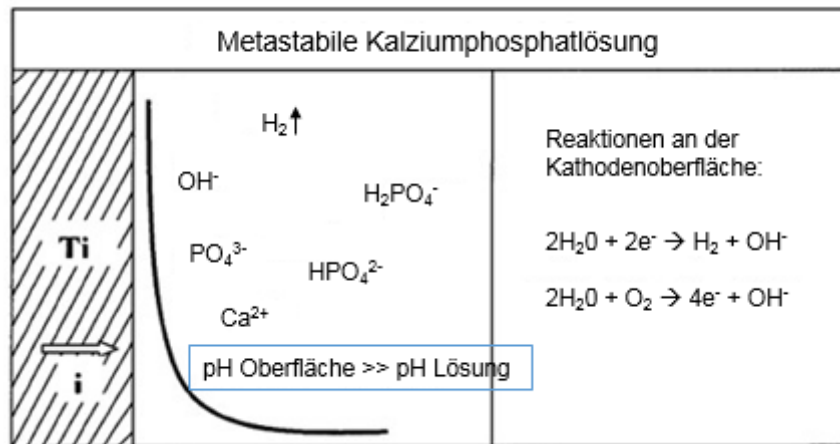
#### 1.4 Elektrochemisch gestützte Abscheidung

Bei der elektrochemisch gestützten Abscheidung (electrochemically assisted deposition - ECAD) werden durch kathodische Polarisierung des Trägerwerkstoffs elektrochemische Reaktionen an deren Oberfläche ausgelöst. Bei den für die ECAD charakteristischen Stromdichten von mehreren Milliampere entlädt sich vorwiegend der Wasserstoff aus den wässrigen Elektrolyten. Somit erfolgt unmittelbar in Oberflächennähe eine Anhebung des pH-Werts, indem durch Spaltung von Wasser und der Entladung der Wasserstoffionen an der Substratoberfläche (Kathode) das Protolysegleichgewicht zugunsten der Hydroxidionen verschoben wird (Gleichung 1 und 2).



In unmittelbarer Oberflächennähe erhöht sich der pH-Wert und führt zu einer lokalen Herabsetzung der Löslichkeit der CPP, sodass in Zeiträumen von etwa 15-60 Minuten aus den im Elektrolyten befindlichen Ionen eine dichte keramische Beschichtung aus Kalziumphosphaten auf der Substratoberfläche (Titanoberfläche) abgeschieden wird.

Abbildung 5 fasst die elektrochemischen Reaktionen der ECAD zusammen und zeigt die Dissoziationsstufen der Phosphationen sowie die Erhöhung des pH-Werts.



**Abbildung 5 Schema des Messprinzips der elektrochemisch gestützten Abscheidung von Kalziumphosphaten**

Ti- Titan; i = Stromstärke

(modifiziert nach Scharnweber D. und Bierbaum S. (2009))

Die Kristallstruktur, die Morphologie sowie die Belegungsdichten der abgeschiedenen Kalziumphosphate werden beeinflusst durch die Stromstärke, die Zusammensetzung des Elektrolyten, die Temperatur und die Abscheidungszeit. Durch Modifikationen der Elektrolytzusammensetzung können weitere Komponenten in die abgeschiedene Schicht integriert werden. Durch den Zusatz von Strontiumionen oder Kupferionen können modifizierte Bruschitschichten auf den Titanoberflächen abgeschieden werden. Von Vorteile ist, dass mittels ECAD auf komplex strukturierten Oberflächen gleichmäßige und reproduzierbare Beschichtungen erzeugt werden können (Scharnweber und Bierbaum (2009); Shadanbabaz et al. (2012); Zhang et al. (2015)).

## 2 Zielstellung

Die elektrochemisch gestützte Abscheidung (ECAD) von Kalziumphosphatschichten auf Titan und gleichzeitige Einlagerung bioaktiver Spurenelemente sind für die Anwendung im dentalen sowie orthopädischen Bereich vorgesehen. Die Maßnahmen zielen darauf ab, die Einheilphase der Implantate zu verkürzen, besonders im Hinblick auf Patienten mit systematischen Erkrankungen wie Osteoporose oder mit schlechten Knochenlagern. Durch die Elektrolytmodifikation mit den bioaktiven Metallionen Strontium- und Kupfer können diese in die Kalziumphosphatschicht eingelagert werden. Durch die Freisetzung bioaktiver Metallionen im physiologischen Umfeld soll der biologische Prozess stimuliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen strontium- und kupfermodifizierte Bruschitschichten untersucht werden, die aus Elektrolyten mit einem Strontiumgehalt von 24 % bezüglich der Kalziumkonzentration mittels ECAD abgeschieden werden. In die mit Strontium modifizierten Kalziumphosphatbeschichtungen soll zusätzlich Kupfer eingebracht werden. Dies soll mit drei Ansätzen realisiert werden. Die elektrochemische Abscheidung von Kupfer wird einerseits durch Kupferzugabe im Elektrolyten sowie andererseits durch die elektrochemische Abscheidung einer Kupferbasisschicht durchgeführt. Mit dem dritten Ansatz zur Kupferimmobilisierung wird der reine Adsorptionsprozess von Kupferionen an eine bereits abgeschiedene Kalziumphosphatbeschichtung analysiert. Ein Teil der hergestellten Proben wird einer hydrothermalen Behandlung mit Natriumhydroxid zugeführt, um den Einfluss der Umwandlung der abgeschiedenen Kalziumphosphatphase auf die Freisetzung der Spurenelemente zu untersuchen.

Untersucht werden soll die Einlagerung der Ionen in die Schichten in Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Trägermatrix, der Immobilisierungsmethode und wie sich diese Parameter auf die Freisetzung der Ionen auswirken. Die zu erreichenden Schichtmassen der Trägermatrizes sollen im Bereich von 250 - 1500  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  liegen und reproduzierbar sein. Für die Freisetzung des Spurenelements Strontium werden 5 - 10  $\mu\text{g}$  pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche und Tag angestrebt. Weiterhin soll am Modellorganismus *Escherichia coli* SM 2029 untersucht werden, inwieweit durch die Art und Weise der Kupferintegration die anvisierte antimikrobielle Wirkung erzielt wird.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

**Tabelle 2 Chemikalien und deren Herkunft**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
D (+) Glucose	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Eisen-(III) Ethylen-Diamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kalziumnitrat-Tetrahydrat	VWR-Chemicals ProLabo®, Dresden
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kupfernitrat- Trihydrat	VWR-Chemicals ProLabo®, Dresden
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Prolin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR-Chemicals ProLabo®, Dresden
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Strontiumnitrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Salzsäure	VWR - Chemicals ProLabo®, Dresden
Schwefelsäure 96%	BASF, Ludwigshafen am Rhein
Salpetersäure: 65%,	VWR-Chemicals ProLabo®, Dresden
Thiamin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trizma®base	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Trypton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kalzium Fluitest® CA CPC	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels
Phosphor: Fluitest® PHOS	Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels
Kupfer (Dibrom-PAESA)	Greiner Diagnostic GmbH, Bahlingen
Live / Dead Cell Viability Assay	Invitrogen, Hennigsdorf

### 3.2 Medien

**Tabelle 3    Verwendete Medien und deren Zusammensetzung**

Medium	Zusammensetzung
Simulierte Körperflüssigkeit nach Tas (Tas-SBF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 112 mM NaCl</li> <li>▪ 27 mM NaHCO<sub>3</sub></li> <li>▪ 3 mM KCl</li> <li>▪ 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> * 6 H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 1 M HCl</li> <li>▪ 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 0,5 mM NaSO<sub>4</sub></li> <li>▪ 50 mM Trizma®base</li> <li>▪ in entionisiertem H<sub>2</sub>O lösen</li> <li>▪ pH-Wert 7,4</li> </ul>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 123 mM NaCl</li> <li>▪ 10,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>▪ 3,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>▪ in entionisiertem H<sub>2</sub>O lösen</li> <li>▪ pH 7,4</li> </ul>
LB-Flüssigmedium (Zusammensetzung nach Luria Bertani Müller)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 5 g/l Hefeextrakt</li> <li>▪ 10 g/l Trypton</li> <li>▪ 10 g/l NaCl</li> <li>▪ 50 µg / ml Kanamycinsulfat</li> </ul>
Biofilmmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>▪ 0,1 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>▪ 0,010 mM Fe - EDTA</li> <li>▪ 10 mM D (+) Glucose</li> <li>▪ 0,002 µM Thiamin</li> <li>▪ 0,08 µM L-Prolin</li> <li>▪ 15,1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>▪ 37,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 22,2 mM KHPO<sub>4</sub></li> <li>▪ 51,3 mM NaCl</li> <li>▪ pH 7,2</li> </ul>



- Fötale Bovines Serum (Chargennummer 740), Herkunft Südamerika, Biochrom AG, Berlin

### 3.3 Materialien

- Titanproben: Material Reintitan (commercially pure, c. p., grade 2), geschliffen mit Fliehkraftanlage und bestrahlt mit Korundpartikeln (MSEKA 30A), Oberflächenspezifikation Rauigkeit ( $R_a$  3,15-3,2  $\mu\text{m}$ , Durchmesser 10 mm, Dicke 2mm, Oberfläche 157,08  $\text{mm}^2$ , Herstellerfirma KLS Martin Group, Mühlheim a.d. Donau
- Suspensionskulturplatte; Nunc Cell Culture, Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf
- Escherichia coli SM 2029, GFP-gelabelt, Übernachtskultur, 137 rpm, 30 °C

### 3.4 Geräte

- Atomabsorptionsspektroskopie: AAS 5FL, Carl-Zeiss-Technology, Jena
- Brutschrank: CO<sub>2</sub>- Incubator, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd, Japan
- Fluoreszenzmikroskop Zeiss Observer. Z1, Carl Zeiss, Jena, Software: ZEN pro 2012, LED-Lichtquelle Colibri.2
- FTIR-Spektrometer: FTS 2000 + Autoimage-System (Perkin Elmer), Software: Auto Image 4.1
- Galvanostat: Jaissle IMP 88PC -100 V, Software: ECM-Win Build 6^U
- Ofen: KOE 10, Padelththerm, Leipzig
- Photoelektronenspektrometer: Amycus (Kratos), Software: CasaXPS 2.2.67
- Rasterelektronenmikroskop: XL-30 ESEM FEG, Philips, Hamburg
- Ultraschallbad: BANDELIN electronic GmbH & Co. KG , Sonorex, Berlin
- Photometer: Tecan Infinite® 200 PRO, Software: i-control™ Microplate Reader, Schweiz
- Schüttelplatte Magnetschüttler Monoshake Drehzahlbereich 100 - 2000  $\text{min}^{-1}$ , Schüttelamplitude 2 mm, HP Labortechnik AG, Oberschleißheim
- Trockenschrank: BINDER GmbH, Tuttlingen

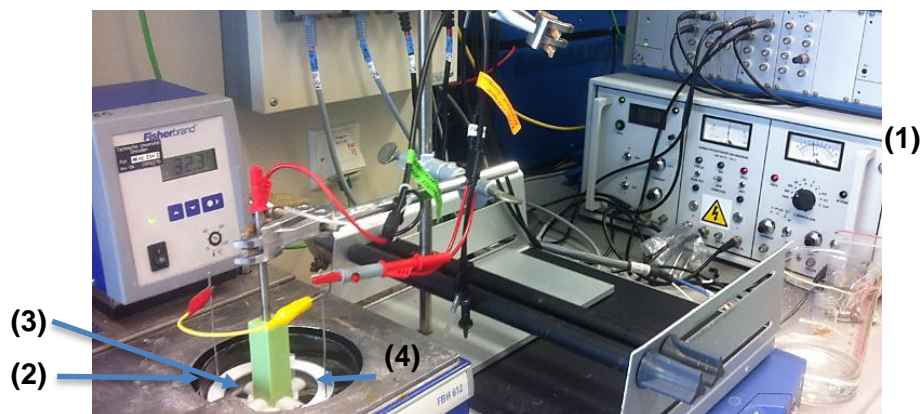
## 4 Methoden

### 4.1 Vorbereitung der Titanoberfläche

Die Titanproben aus Reintitan mit einem Durchmesser von 10 mm und eine Höhe von 2 mm wurden hergestellt und sandgestrahlt durch KLS Martin Group. Vor dem Einsatz wurden die Titanproben für fünf Minuten mit einer Ätzlösung aus 10,18 M HCl und 17,97 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 108 °C behandelt. Anschließend wurden die Proben 2 mal 15 Minuten in sterilen, entionisiertem Wasser im Ultraschallbad von Säure- und Strahlgutresten gereinigt. Zur Vermeidung von möglichen Kontaminationen der geätzten Titanproben lagerten diese bis zur Durchführung der elektrochemisch gestützten Abscheidung 1 - 2 Tage in Reinstwasser (0,055 µS / cm).

### 4.2 Elektrochemische Versuchsanordnung

Zur Durchführung der elektrochemisch gestützten Abscheidung (ECAD) wurde eine Versuchsanordnung gemäß Abbildung 6 verwendet. Diese setzte sich aus einem mit einem Galvanostat (1) verbundenen Probenhalter und einer bei 30 °C temperierten Elektrolytlösung in einem Glaszylinder (2) zusammen. Es wurde ein 2 - Elektroden-Aufbau verwendet: vier, in den Probenhalter eingespannte Titanproben (3) wurden als Kathode geschaltet und ein den Probenhalter umgebendes Platingitter (4) fungierte als Anode.



**Abbildung 6 Versuchsanordnung der elektrochemisch gestützten Abscheidung**

(1) Galvanostat (2) bei 30 °C temperierte Elektrolytlösung in einer Glasschale (3) Probenhalter mit vier eingespannten Titanproben (Arbeitselektrode/Kathode) (4) ein den Probenhalter umgebendes Platingitter (Bezugselektrode/Anode)

Die Durchführung der ECAD von Kalziumphosphaten auf Titanoberflächen erfolgte, indem der Probenhalter mit vier eingespannten Titanproben in circa 300 ml Elektrolytlösung getaucht und die galvanostatische Polarisierung mit gleichbleibender Stromstärke ( $1,5 \text{ A/cm}^2$ ) über einem Zeitraum von 2400 s gestartet wurde. Diese Abscheidung wurde bis zur ersten Minuten statisch durchgeführt. Weil eine gestörte Abscheidung von Kalziumphosphaten auf den Titanoberflächen durch entstehende Wasserstoffblasen im Abscheidungsprozess (siehe Kapitel 1.4, Gleichung 1) zu vermeiden ist, wurde der Probenhalter ab der ersten Minute bis Beendigung der ECAD durch die Verbindung mit einem Schüttler bei 50 rpm rotiert. Anschließend wurde der Probenhalter mit den beschichteten Titanproben aus der Elektrolytlösung entnommen und zur anschließenden Reinigung für 2 mal 15 Minuten in Reinstwasser ( $0,055 \mu\text{S/cm}$ ) bei 100 rpm geschüttelt. Die Trocknung der beschichteten Titanproben erfolgte mit einem  $\text{N}_2$ -Strom mit anschließender Lagerung in Wellplatten.

#### **4.3 Beschichtung der Titanoberfläche**

Die Beschichtung der Titanoberfläche mit Brushit mit gleichzeitiger Einlagerung der bioaktiven Spurenelemente Strontium und Kupfer in die Beschichtungen wurde mit vier Ansätzen erzielt: (1) Zugabe von Strontium im Elektrolyten, (2) Zugabe von Kupfer im Elektrolyten, (3) Abscheidung von CPP-Beschichtungen auf einer Kupferbasisschicht, (4) Kupferbadbehandlung von bereits abgeschiedenen CPP-Beschichtungen.

Der Standardansatz des Elektrolyten zur elektrochemisch gestützten Abscheidung von Brushit setzte sich aus 50 mM Ammoniumdihydrogenphosphat sowie aus 83,5 mM Kalziumnitrat - Tetrahydrat zusammen. Nach Beendigung des Abscheidungsprozesses wurden die beschichteten Titanproben in Reinstwasser 2 mal 15 Minuten gewaschen, mit einem  $\text{N}_2$ -Strom getrocknet und in Wellplatten gelagert.

##### **4.3.1 Herstellung einer Strontium-modifizierten Titanoberfläche**

Die Herstellung einer Strontium - modifizierten Titanoberfläche mit elektrochemisch gestützter Abscheidung (Kapitel 4.2) wurde mit Strontiumzusatz im Elektrolyten durchgeführt. Auf Grundlage von Ergebnissen eigener Voruntersuchungen

hinsichtlich der Belegungsdichte an Strontium in der abgeschiedenen Beschichtungsoberfläche sowie dem Freisetungsverhalten in einem serumhaltigen Inkubationsmedium wurde die Konzentration an Strontiumionen auf 20 mM im Elektrolyten festgelegt.

Tabelle 4 fasst die Stoffmengenkonzentrationen an Ammoniumdihydrogenphosphat, Kalziumnitrat - Tetrahydrat sowie Strontiumnitrat im Elektrolyten, der zur elektrochemisch gestützten Abscheidung von Brushit und strontiumhaltigen Brushit eingesetzt wird, zusammen. Die Gesamtkationenkonzentration im Elektrolyten wurde auf 83,5 mM festgelegt, sodass bei der Anwendung strontiumhaltiger Elektrolyten eine Anpassung der Konzentrationen an Kalzium erfolgte.

**Tabelle 4 Konzentrationen an Kalzium, Phosphat und Strontium im Elektrolyten**

Proben- bezeichnung	$c((\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4)$ [mM]	$c(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ [mM]	$c(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$ [mM]
Brushit (Bru)	50	83,5	0
Co - Abscheidung Brushit und 20 mM Strontium (Bru /20 mM Sr)	50	63,5	20

#### 4.3.2 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch Zugabe von Kupfer im Elektrolyten

Zusätzlich zum bereits beschriebenen Ansatz für die Brushitabscheidung mit bzw. ohne Strontium (Kapitel 4.2) wurde dem Elektrolyten für diese Abscheidungsvariante eine konzentrierte Kupfernitratlösung zum Elektrolyten hinzugefügt, um eine finale Kupferkonzentration von 0,5 mM zu erreichen.

#### 4.3.3 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch elektrochemische Abscheidung einer Kupferbasisschicht

Die elektrochemische Abscheidung einer Kupferbasisschicht auf Titanproben wurde mit einem schwefelsauren Elektrolyten (pH 1) bestehend aus 1,8 M Schwefelsäure und 0,24 M Kupfersulfat-Pentahydrat bei Zimmertemperatur durchgeführt (Magagnin

et al. (2001)). Um den Einfluss elektrochemischer Parameter wie z.B. Abscheidungs-  
dauer, Stromstärke und Konzentration der Kupfersulfatlösung zu untersuchen, wurde  
die elektrochemische Abscheidung einer Kupferbasisschicht auf einer  
Titanoberfläche zunächst mit unterschiedlichen Parametersets (Tabelle 5)  
durchgeführt. Direkt im Anschluss der elektrochemisch abgeschiedenen  
Kupferbasisschicht erfolgte die ECAD der strontiumfreien bzw. strontiumhaltigen  
Beschichtungszustände mit der im Kapitel 4.2 erläuterten Methode.

**Tabelle 5 Parameterset der elektrochemischen Abscheidung einer Kupferbasisschicht auf Titanoberfläche**

Parameter		
Abscheidungsdauer	7,5 min , 10 min, 12,5 min	2,5 min, 30 sec, 10 sec
Stromdichte [mA / cm <sup>2</sup> ]	3	9
Konzentration der Kupfersulfatlösung [M]	0,24, 0,125, 0,024	0,24, 0,125, 0,02
Drehzahl der Schüttelplatte [rpm]	0, 50, 100	

#### **4.3.4 Herstellung einer Kupfer-modifizierten Titanoberfläche durch Proben- einlagerung in Kupferbad**

Nach Beendigung der elektrochemischen Abscheidung von CPP mit und ohne  
Strontiumzusatz (Kapitel 4.2) wurden diese Beschichtungen in jeweils 1 ml 0,5 mM  
Kupfernitratlösung (pH-Wert nach Auflösung in Wasser: 5,1) für 1 h bzw. für 24 h  
ausgelagert.

#### **4.3.5 Nachbehandlung einiger Beschichtungszustände mit Natriumhydroxid**

Im Anschluss an die Probenherstellung wurde ein Teil der so erhaltenen Proben  
einer hydrothermalen Behandlung mit NaOH zugeführt. Die Probeneinlagerung der  
Beschichtungszustände wurde in jeweils 0,1 M NaOH in 20 ml Glasflaschen mit  
Schraubverschluss bei 65 °C über einen Zeitraum von 4 h im Trockenschrank  
durchgeführt. Anschließend wurden diese Proben vorsichtig in destilliertem Wasser  
gespült und nachfolgend 2 h bei 65 °C im Trockenschrank getrocknet (Huang et al.

(2015)). Nach Beendigung dieser Trocknungszeit wurden die hergestellten Probenzustände in Wellplatten gelagert.

#### **4.4 Probensterilisierung**

Vor der Durchführung der Freisetzungsstudie (Kapitel 4.5) sowie des Zellversuchs mit *Escherichia coli* (*E.coli*) SM 2029 (Kapitel 4.7) wurden die Proben in Multiwellplatten gelagert und  $\gamma$ -sterilisiert. Die  $\gamma$ -Sterilisierung erfolgte bei dem BBF Sterilisationsservice GmbH in Kernen-Rommelshausen bei mindestens 25 kGy.

#### **4.5 Freisetzungsstudie**

Die elektrochemisch hergestellten spurenelementhaltigen Beschichtungszustände mit und ohne NaOH-Nachbehandlung wurden in einer simulierten Körperflüssigkeit (simulated body fluid - SBF) nach Tas (Tas (2000)) supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum eingelagert. Diese Probeneinlagerung in 24-Wellplatten wurde in jeweils 1 ml SBF bei 37 °C mit 8%iger CO<sub>2</sub>-Begasung über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. Das Inkubationsmedium wurde täglich vollständig gewechselt und das abgenommene Medium für die nachfolgende Analytik in Eppendorftubes gesammelt. Weiterhin wurde jeweils ein ausgelagerter Probenzustand mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

#### **4.6 Probenanalytik**

Die Charakterisierung der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände erfolgte mittels REM, Kits zur Bestimmung der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat, und Kupferionen sowie der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) zur Konzentrationsbestimmung von Strontiumionen. Weiterhin wurden die Proben mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy - XPS) und Fourier - transformierte Infrarotspektroskopie (FTIR) analysiert.

##### **4.6.1 Rasterelektronenmikroskopie**

Die stickstoffgetrockneten Beschichtungszustände wurden auf dem Objektträger befestigt, am Probenrand mit Leitsilber versehen und mit Kohlenstoff im Hochvakuum bedampft. Die Kohlenstoffbedampfung sollte eine Aufladung der Beschichtungen bei einfallenden Elektronen verhindern und demzufolge eine optimale Abbildung der Oberfläche der Beschichtungszustände liefern. Die rasterelektronischen Mikroskopieaufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV und

einem Arbeitsabstand von 6 mm mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) XL-30 ESEM FEG der Firma Phillips® aufgenommen.

#### **4.6.2 Bestimmung der Konzentrationen an Kalzium, Phosphat und Kupfer mittels fotometrischen Farbtests**

Die hergestellten Beschichtungszustände wurden durch Zugabe von jeweils 1 ml konzentrierter Salpetersäure und 30 minütigem Schütteln bei 300 rpm aufgelöst. Anschließend wurden die entnommenen salpetersauren Lösungen gesammelt und mit den kommerziellen Kits Kalzium Fluitest® CA CPC, Phosphor Fluitest® PHOS sowie Kupfer mit der Methode Dibrom-PAESA mit dem Plattenlesegerät Infinite® 200PRO (Tecan) analysiert. Zur Bestimmung der Kalziumionenkonzentrationen wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 578 nm, der Phosphationenkonzentrationen bei 340 nm sowie der Kupferionenkonzentration bei 578 nm gemessen. Die fotometrischen Tests wurden mit Kalibrierkurven, die mit den kommerziellen Tests enthaltenen Standardlösungen ermittelt wurden, ausgewertet.

#### **4.6.3 Bestimmung der Konzentration an Strontium mit Atomabsorptions-spektroskopie**

Die salpetersauren Lösungen, die zur Auflösung von kupferhaltigen Beschichtungszuständen verwendet wurden, wurden mit 0,1 % Kaliumchlorid verdünnt. Die Bestimmung der Konzentrationen an Strontiumionen erfolgte an dem Gerät AAS 5FL (Carl Zeiss) bei einer Wellenlänge von 460,7 nm. Die Kalibrierkurven wurden mit entsprechenden Standardlösungen (0 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l) hergestellt.

#### **4.6.4 Röntgenphotoelektronenspektroskopie**

Zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der Beschichtungsflächen wurde die XPS verwendet. Die Anregung erfolgte mit nichtmonochromatischer Al-K $\alpha$ -Strahlung (1486,6 eV) mit einer Leistung von 240 W bei einer Beschleunigungsspannung von 8 kV. Die Auflösung des Spektrometers betrug ca. 2 eV. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software CasaXPS (Version 2.2.67). Zur Korrektur der durch Aufladung der Oberflächen bedingten Verschiebung der Spektren wurden die Energieskala anhand des Ca-2p $_{3/2}$ -Peaks auf die theoretische Bindungsenergie für Bruskit von 347,2 eV kalibriert. Die quantitative Elementarzusammensetzung wurde aus den Peakflächen mit Verwendung von

elementspezifischen Empfindlichkeitsfaktoren und der Spektrometerübertragungsfunktion berechnet. Weil das Elementspektrum von Sr  $3p_{1/2}$  mit dem Spektrum von C1s überlappt, wurde zur Entfaltung und Bestimmung der Flächen der überlappenden Peaks das bekannte Flächenverhältnis der Peakflächen von Sr  $3p_{3/2}$  zu Sr  $3p_{1/2}$  von 2:1 verwendet. Im Bereich von 134 eV überlappen sich die Peaks P 2p und Sr 3d vollständig. An der Flanke des gemessenen Peaks war eine Schulter zu hohen Bindungsenergien erkennbar, der Sr  $3d_{3/2}$  zugeordnet werden konnte. Dadurch war eine Entfaltung von Sr 3d und P 2p möglich. Allerdings ist bei dieser Herangehensweise zur Quantifizierung mit einer hohen Fehleranfälligkeit zu rechnen.

#### 4.6.5 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Die Phasenzusammensetzung der Beschichtungszustände wurde mit Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) mit dem Spektrometer FTS 2000 und Autoimage-System (Perkin Elmer) im Bereich von  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von  $1,0 \text{ cm}^{-1}$  untersucht. Die Spektren wurden im Reflexionsmodus mit mindestens 6 Messbereichen a  $100 * 100 \mu\text{m}^2$  aufgenommen. Zur Aufnahme des Untergrundspektrums wurde eine polierte Titanoberfläche verwendet. Anschließend wurde dieses Untergrundspektrum von den FTIR - Spektren der Beschichtungszustände subtrahiert.

#### 4.7 Bakterienadhäsion an spurenelementhaltigen Beschichtungen

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) SM 2029, (GFP - gelabelt) wurde zur Untersuchung der Bakterienadhäsion an spurenelementhaltigen CPP in einem Biofilmmedium verwendet. Zur Glycerolentfernung wurde die bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerte Bakteriensuspension bei 2500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 1 ml LB mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Kanamycin resuspendiert. Anschließend wurde diese Bakterienlösung in ca. 20 ml LB-Medium überführt und bei  $30^\circ\text{C}$  auf einer Schüttelplatte bei 137 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von mindestens 0,8 inkubiert. Im Anschluss wurden 15 ml der *E.coli* - Suspension für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und in 5 ml Biofilmmedium resuspendiert. Für einen weiteren Waschschriff wurde die Zentrifugation mit denselben Parametern und der Resuspension im Biofilmmedium wiederholt. Nach Vereinzelung der Bakterienlösung mit einem  $5 \mu\text{m}$  Filter wurde mit der Messung der optischen Dichte des Filtrats bei 600 nm eine Zellzahl von  $10,71 * 10^8$  Zellen/ml bestimmt. Anschließend erfolgte das Aussäen der Bakteriensuspension auf den in einer



Suspensionskulturplatte gelagerten spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen mit jeweils einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml sowie mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml in je 1 ml Biofilmmedium. Die Einstellung der Zellzahl erfolgte über eine zuvor im Institut für Lebensmitteltechnologie und Bioverfahrenstechnik ermittelte Kalibrierfunktion (Original von Mulansky et al. (2015)).

Für die Inkubation der beschichteten Titanproben in der Bakteriensuspension wurden jeweils 500 µl Biofilmmedium vorgelegt und anschließend 500 µl der doppelt konzentrierten Bakteriensuspension zugegeben. Für die Referenzlösungen mit bekannten Kupferkonzentrationen wurden entsprechend doppelt konzentrierte Kupferlösungen in dem Biofilmmedium vorgelegt. Die Inkubation der Beschichtungszustände mit der *E.coli*-Suspension wurde bei 37 °C auf einer Schüttelplatte mit 500 rpm durchgeführt. Zur Inkubation wurden nur die inneren Wells einer 48-well-Suspensionskulturplatte verwendet. Die äußeren Wells in dieser Wellplatte wurden jeweils mit 1 ml sterilem Wasser gefüllt, um die Verdunstung der Bakteriensuspension in den inneren Wells zu minimieren. Nach einer 17-stündigen Inkubationszeit der beschichteten Titanproben erfolgte eine Extinktionsmessung ( $OD_{600}$ ) der jeweiligen abgenommenen Bakteriensuspensionen. Die Proben wurden 3-mal mit je 1 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und 5 Minuten Schütteln bei 200 rpm gespült, um nicht adhärenente Bakterien zu entfernen. Anschließend erfolgte die mikroskopisch gestützte Ermittlung der von den Bakterien belegten Oberfläche an einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 20x-Okulars mit je 15 Aufnahmen pro Probe unter Ausnutzung der Eigenfluoreszenz durch das innerzellulär gebildete GFP. Die Ermittlung der prozentual von Bakterien belegten Fläche erfolgte mittels Image J (Version: Image J (Fiji) V 2.0.0-rc54/1.51, java 1.8.0\_66) nach Einstellung des Schwellwertes unter Abgleich mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Bedeckung der Oberfläche wurde dabei auf die projizierte Stirnfläche bezogen. Zusätzlich erfolgte zur Beurteilung der Zellviabilität die Anfärbung der adhärenenten Bakterien mittels eines Live/Dead Kits mit den Farbstoffen SYTO® 9 und Propidiumiodid. Zur Färbung wurde ein Reaktionsgemisch aus jeweils 3 µl Lösung 1 und Lösung 2 in 1 ml H<sub>2</sub>O hergestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µl auf die jeweilige Probe pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben in H<sub>2</sub>O gespült und bis zur Fluoreszenzmikroskopie in H<sub>2</sub>O gelagert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte für den Farbstoff SYTO® 9 mit Wellenlängen von 485 nm (Anregung) und

498 nm (Emission) bzw. für Propidiumiodid mit Wellenlängen von 535 nm (Anregung) und 617 nm (Emission).

#### **4.8 Allgemeine Angaben zum Versuchsdesign und Probenzahlen**

Jeweils vier Proben pro Beschichtungszustand wurden zur nasschemischen Analyse sowie jeweils eine Probe zur Untersuchung mit REM, XPS und FTIR Messung verwendet.

Zur Beurteilung des Freisetzungsverhaltens bei Inkubation in serumhaltiger SBF wurden pro Probenzustand je drei beschichtete Titanproben eingesetzt und der nasschemischen Analyse zugeführt. Nach Inkubation wurde je eine Probe zur Analyse mittels REM untersucht.

Zur Darstellung der Belegungsdichte der Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- sowie Strontiumionen in den Beschichtungen sowie der gemessenen Konzentrationen im Inkubationsmedium wurden in den Abbildungen die berechneten Konzentrationen als Mittelwerte sowie die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken abgebildet. Da der Probenhalter so konstruiert war, dass nur die Stirnseite der Proben beschichtet wurde, wurden die Belegungsdichten entsprechend der projizierte Stirnfläche errechnet. Auf Grund der bisher fehlenden Versuchswiederholungen wurde auf eine konsequente Eintragung der statistischen Signifikanzen verzichtet. Für alle Messwerte, deren Fehlerbalken sich nicht überlappen, wurden statistische Signifikanzen für ein gewähltes Signifikanzniveau von 0,05 mittels t-Test ermittelt.

Zur Untersuchung der Bakterienadhäsion an spurenelementhaltigen CPP in einem Biofilmmedium wurden pro Beschichtungszustand je drei beschichtete Titanproben in eine 24-Wellplatte eingesetzt. Zur Beurteilung der Zellviabilität der adhärenen Bakterien wurde pro Probenzustand jeweils eine beschichtete Titanprobe verwendet.

## 5 Ergebnisse

Mittels ECAD wurden, wie im Abschnitt 4.3 beschrieben, die Spurenelemente Kupfer und Strontium einerseits als singuläre Zusatzkomponente bzw. andererseits in Kombination beider Elemente in Kalziumphosphatbeschichtungen auf Titanoberflächen integriert. Die Charakterisierung der erhaltenen Oberflächenzustände erfolgte hinsichtlich der Zusammensetzung der Hauptkomponenten der Kalziumphosphatmatrix (Kalzium, Phosphat) sowie der integrierten Spurenelemente Kupfer und Strontium nach Auflösung der Schicht in konzentrierter Salpetersäure. Die chemische Phasenzusammensetzung der abgeschiedenen CPP mit integrierten Spurenelementen wurde mit FTIR untersucht. Weiterhin wurden mit XPS der chemische Status sowie die prozentualen Anteile der erfassten Elemente in den Beschichtungsoberflächen analysiert. Außerdem war zu prüfen, inwieweit unterschiedliche Belegungsdichten bzw. die verschiedenen Beschichtungsvarianten das Freisetzungsverhalten der Spurenelemente unter annähernd physiologischen Verhältnissen beeinflussen. Die Morphologie der Oberflächenzustände wurde mittels REM vergleichend vor bzw. nach der Inkubation in dem Freisetzungsmedium dokumentiert. Um das antimikrobielle Potenzial von kupferhaltigen Beschichtungszuständen auf das GFP - gelabelte Bakterium *E.coli* SM 2029 zu untersuchen, wurden die prozentual mit Bakterien belegte Beschichtungsoberfläche bestimmt sowie die Zellviabilität durch Anfärbung der adhärenenten Bakterien mittels eines Live/Dead Kit untersucht.

Trotz Anwendung verschiedener Versuchsparameter wie beispielsweise Stromstärke, Abscheidungsdauer zur Erzeugung einer Kupferbasisschicht oder Dauer der Probeneinlagerung in einer Kupferlösung wurden Belegungsdichten an Kupfer in unterschiedlichen Größenordnungen erzielt.

In der Legende und in den Beschriftungen der Abbildungen sowie in den Tabellen wird das strontiumhaltige Bruschit - Co-Abscheidung Bruschit mit 20 mM Strontium - als jeweils mit Bru /20 mM Sr abgekürzt.

## 5.1 Charakterisierung der unterschiedlich beschichteten Titanoberflächen

### 5.1.1 Belegungsdichten der Hauptkomponenten der unterschiedlichen Beschichtungszustände

Abbildung 7 stellt die Belegungsdichten an Kalzium-, Phosphat -, Strontium- und Kupferionen für die spurenelementhaltigen Kalziumphosphatphasen (sCPP) unter Einbeziehung von Kupferionen gegenüber. Als Beschichtungsstrategien wurden drei Ansätze verfolgt: erstens Integration des Kupfers in die Abscheidung der CPP - Matrix, zweitens die Abscheidung einer Kupferbasisschicht vor der Abscheidung von CPP, sowie drittens nachträgliche Integration durch Adsorption an eine bereits abgeschiedene CPP. Die bereits zuvor etablierte Integration des Kupfers in die CPP - Abscheidung fungierte als Referenzzustand. Für diesen Zustand wurde ein hoher Anteil des immobilisierten Kupfers bei Inkubation in proteinhaltiger SBF bereits innerhalb der ersten Inkubationsperiode von 24 h freigesetzt, während in den folgenden drei Tagen nur noch eine minimale Freisetzung im Bereich von 0,5-0,7 µg/ml erfolgte (s. Anhang 1). Durch Modifizierung der Art und Weise der Kupferintegration sollte untersucht werden, ob andere Freisetzungskinetiken - entweder eine gleichmäßigere Verteilung des Kupfers auf einen längeren Freisetzungszeitraum oder eine 2-Schritt-Freisetzung (ein initialer Peak gefolgt von einer gleichmäßigen Freisetzung auf niedrigerem Niveau) - realisierbar sind.

Mit dem zusätzlichen Referenzzustand Brushit sollte im Vergleich zu den spurenelementhaltigen Beschichtungen die Zusammensetzung der Hauptkomponenten der Kalziumphosphatmatrix ohne Einfluss der Spurenelemente untersucht werden.

Im Vergleich zum Referenzzustand Brushit lagen die Belegungsdichten an Kalzium sowohl bei den strontiumfreien Beschichtungszuständen mit einer Kupferbasisschicht als auch mit nachträglicher Kupferbadbehandlung ca. 35-40 % niedriger. Eine Verminderung der Phosphatbelegungsdichte in der Größenordnung von ca. 35-45 % konnte ebenfalls bei den in Kupferbad behandelten CPP sowie den CPP mit einer Kupferbasisschicht festgestellt werden.

Bei Betrachtung der Belegungsdichten in den Beschichtungen mit und ohne Strontiumzusatz im Elektrolyten konnte folgender Zusammenhang beobachtet werden: sowohl für die Beschichtungsvariante mit Kupferbasisschicht als auch mit Kupferbadbehandlung waren bei den strontiumhaltigen Beschichtungen die

abgeschiedenen Belegungsdichten an Kalzium um ca. 30-43 % und an Phosphat um ca. 10-12 % niedriger.

Wurde die Kupferbasisschicht unter Zugabe von Ascorbinsäure zum schwefelsauren Elektrolyten zur elektrochemischen Abscheidung erzeugt, so wurden im Vergleich zur direkten Abscheidung auf den geätzten Proben unter identischen Abscheidungsbedingungen eine veränderte Schichtzusammensetzung erhalten. Während die Belegungsdichte an Phosphat im Vergleich zur direkten Abscheidungsvariante unverändert war, wurden unter Zugabe von Ascorbinsäure 25 % niedrigere Belegungsdichte an Kalzium abgeschieden.

Im Anschluss an die Probenherstellung mit unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden von Strontium- und Kupferionen, wurde ein Teil der so erhaltenen Proben einer hydrothermalen Behandlung mit NaOH zugeführt, um den Einfluss der Umwandlung der abgeschiedenen Kalziumphosphatphase auf die Freisetzung der Spurenelemente zu untersuchen. Zunächst wurde untersucht, inwieweit dieser Umwandlungsschritt zu einer Änderung der Beschichtungszustände vor dem Beginn der Inkubation im serumhaltigen Medium führte. Der Referenzzustand Kupferzugabe im Elektrolyten wurde keiner NaOH-Behandlung zugeführt, weil aus Voruntersuchungen bereits bekannt war, dass eine nahezu vollständige Freisetzung der immobilisierten Kupferionen im ersten Inkubationsintervall erfolgt (s. Anhang 1).

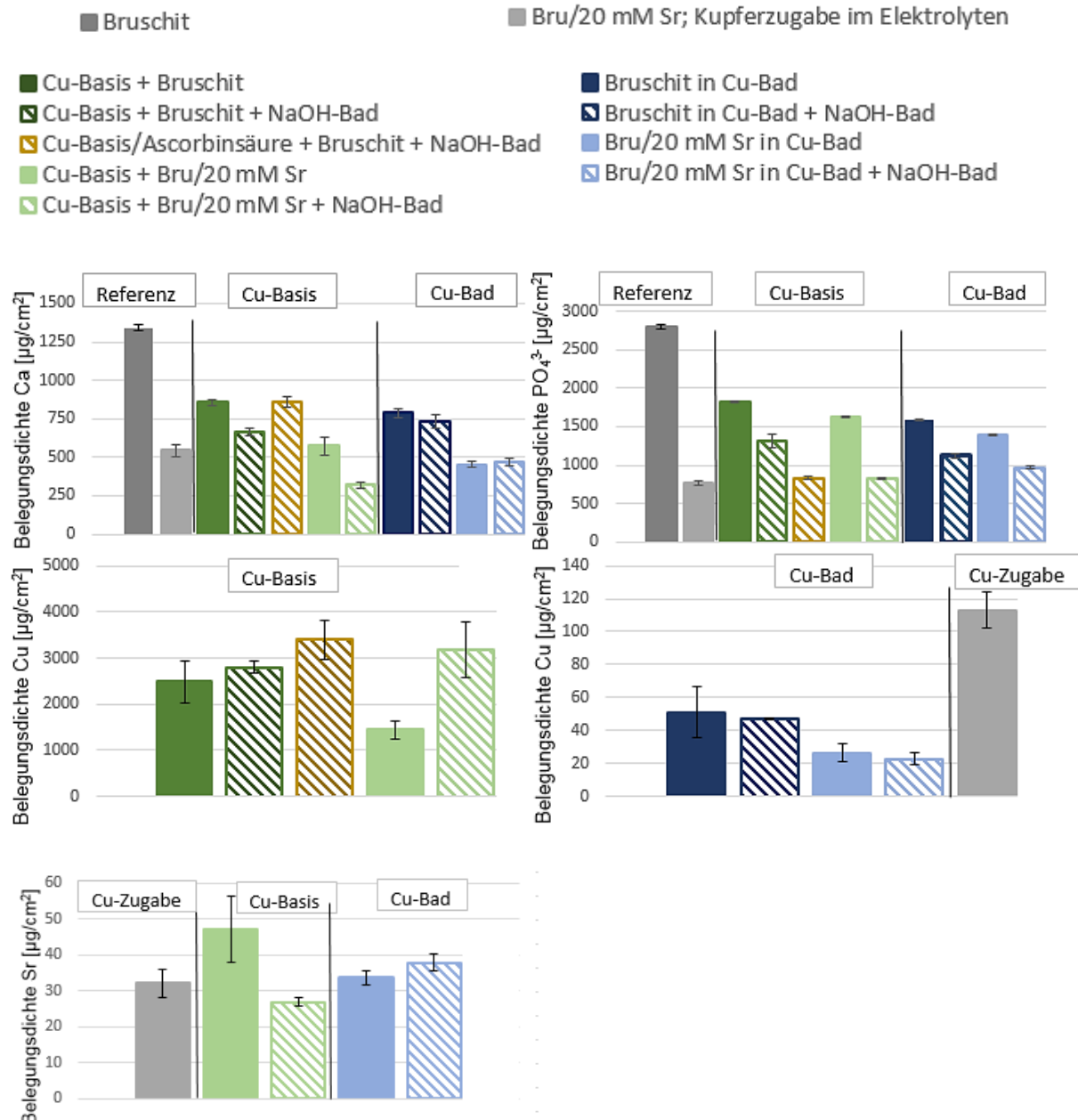
Wurden die strontiumfreien sowie die strontiumhaltigen Beschichtungszustände nach der Kupferbadbehandlung zusätzlich in NaOH gelagert, so veränderten sich die Belegungsdichten an Kalzium im Vergleich zu den nicht mit NaOH-behandelten Beschichtungen nur geringfügig, während die Belegungsdichten an Phosphat nach der NaOH-Nachbehandlung ca. 25-45 % niedriger lagen. Im Gegensatz dazu bewirkte die NaOH-Nachbehandlung im Fall der abgeschiedenen CPP auf Kupferbasisschichten eine Verminderung der Kalziumbelegungsdichte in der Größenordnung von ca. 30 % und an Phosphat von ca. 30-50 %.

Erfolgte die Immobilisierung des Kupfers in Form einer Kupferbasisschicht an der Titanoberfläche, so wurde bereits bei kurzen Abscheidungszeiten von 30 sec vergleichsweise hohe Menge an Kupfer in der Größenordnung von 1500-3400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  abgeschieden. Mit dem Zusatz der L-Ascorbinsäure zur elektrochemischen Abscheidung einer Kupferbasisschicht sollte untersucht werden, ob die Adhäsion des Kupfers an die Titanoberfläche verbessert wird und infolge die Freisetzung von Kupferionen aus der Beschichtung beeinflusst wird. Jedoch konnten

keine wesentlichen Unterschiede in den Belegungsdichten an Kupfer in den strontiumfreien CPP auf einer Kupferbasisschicht festgestellt werden. Voruntersuchungen zur Herstellung einer Kupferbasisschicht mit Variationen der Stromdichte und Konzentration der Kupfersulfatlösung zeigten, dass eine Erhöhung der Stromdichte von  $3 \text{ mA/cm}^2$  auf  $9 \text{ mA/cm}^2$  zu niedrigeren Belegungsdichten an Kupfer mit homogenen Schichten führte (s. Anhang 2). Wurde das Kupfer im Zuge der Abscheidung der CPP-Matrix dem kalzium- und phosphathaltigen Elektrolyten zugesetzt, so wurde eine wesentlich geringere Belegungsdichte von  $110 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  erhalten. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Kupfer eine hohe Affinität zu Bruskit hat, wurde als weitere Immobilisierungsvariante die nachträgliche Adsorption an eine bereits abgeschiedene CPP im Vergleich untersucht. Nach einstündiger Adsorptionszeit, was bereits der anderthalben Abscheidungsdauer entspricht, wurden nur  $27 \pm 4,2 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  (Bruskit) bzw.  $13 \pm 5,7 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  (Bruskit mit Strontiumzusatz) immobilisiert. Durch Verlängerung der Adsorptionszeit auf 24 h konnte die Belegungsdichte auf ca.  $50 \pm 15 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  (Bruskit) bzw.  $26 \pm 6 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  erhöht werden. Die so erhaltenen Kupfermengen waren um ca. 50 % geringer als die während der CPP-Abscheidung integrierten Massen.

Mit der Zugabe von Strontium zum kalzium- und phosphathaltigen Elektrolyten mit anschließender Adsorption von Kupfer aus einer Lösung wurde eine deutlich geringere Belegungsdichte an Kupfer von ca. 50 % detektiert. Die abgeschiedenen Massen an Kupfer in den Kupferbasisschichten sollten vergleichbar sein. Daher kann die Verringerung der Belegungsdichte an Kupfer um ca. 40 % bei anschließender Abscheidung einer strontiumhaltigen Beschichtung auf eine mögliche Störung des Abscheidungsprozesses mit Schwankungen der abgeschiedenen Belegungsdichten zurückgeführt werden.

Unabhängig von den angewendeten Methoden zur Kupferintegration und den resultierenden abgeschiedenen Belegungsdichten an Kupfer lagen die abgeschiedenen Massen an Strontium in dem Größenbereich von ca.  $25 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  bis ca.  $48 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ .



**Abbildung 7** Belegungsdichten an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer-, Strontiumionen nach Abscheidung von CPP-Beschichtungen auf Titanoberflächen

### 5.1.2 Molare $\text{Ca}/\text{PO}_4^{3-}$ -, $(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{PO}_4^{3-}$ -, sowie $(\text{Ca}+\text{Cu})/\text{PO}_4^{3-}$ - Verhältnisse der Beschichtung nach Abscheidung

Zur Charakterisierung der erhaltenen Oberflächenzustände hinsichtlich einer möglichen Substitution des zweiwertigen Kalziums durch die zweiwertigen Spurenelemente Strontium- sowie Kupferionen wurden die jeweiligen molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der Beschichtungen berechnet und in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Kalzium und Kupfer zu Phosphat-Verhältnisse der auf den Kupferbasisschichten abgeschiedenen CPP werden aufgrund der Annahme, dass

die Kupferbasisschicht und die CPP als zwei separate Beschichtungen anzusehen sind, nicht angegeben.

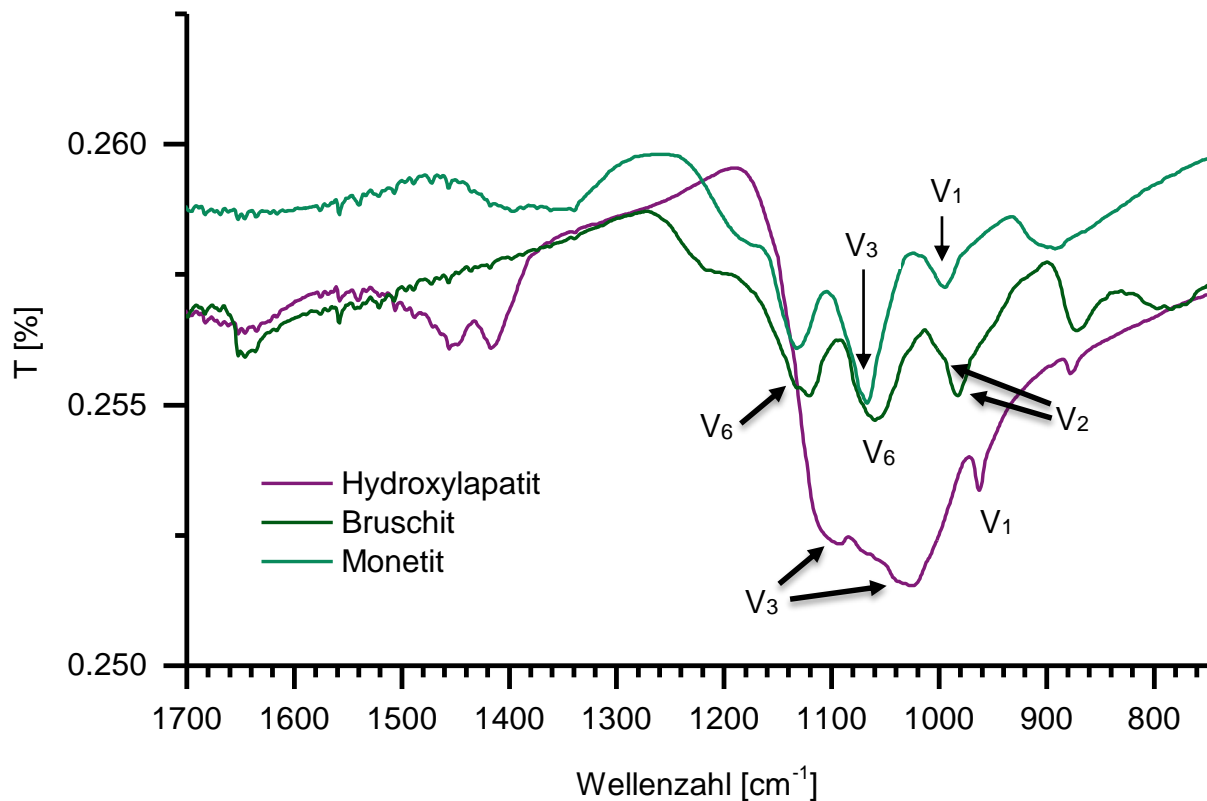
**Tabelle 6 Molare Ca/P-, (Ca+Cu)/P - sowie (Ca+Sr)/P - Verhältnisse nach Abscheidung**

		Probe	Molares Ca/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis	Molares (Ca+Sr)/ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis	Molares (Ca+Cu)/ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis
Referenz 1	Ohne NaOH- Bad	Bruskit	1,13 ± 0,01	-	-
Referenz 2 Kupferzugabe im Elektrolyten	Ohne NaOH- Bad	Bruskit / 20 mM Sr	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,04	0,6 ± 0,04
Kupferbad- behandlung	Ohne NaOH- Bad	Bruskit	1,18 ± 0,02	-	1,2 ± 0,01
		Bruskit / 20 mM Sr	0,77 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,78 ± 0,06
	Mit NaOH- Bad	Bruskit	1,55 ± 0,01	-	1,59 ± 0,01
		Bruskit / 20 mM Sr	1,13 ± 0,04	1,17 ± 0,03	1,15 ± 0,03
Kupfer- basisschicht	Ohne NaOH- Bad	Bruskit	1,11 ± 0,01	-	n.a.
		Bruskit / 20 mM Sr	0,83 ± 0,07	0,86 ± 0,06	n.a.
	Mit NaOH- Bad	Bruskit	1,24 ± 0,2	-	n.a.
		Ascorbinsäure + Bruskit	1,58 ± 0,09	-	n.a.
		Bruskit / 20 mM Sr	0,91 ± 0,05	0,94 ± 0,04	n.a.



### 5.1.3 Phasenzusammensetzung der Beschichtungszustände

Die Spektren der FTIR - Messungen der Referenzzustände Bruschat, Hydroxylapatit und Monetit sind in Abbildung 8 dargestellt. Im Spektrum des Referenzzustandes Bruschat wurden charakteristische Banden bei Wellenzahlen von  $987\text{ cm}^{-1}$ ,  $1000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1058\text{ cm}^{-1}$  und  $1137\text{ cm}^{-1}$  detektiert. Weitere markante Banden konnten bei  $880\text{ cm}^{-1}$ ,  $1110\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  und  $1010\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen werden. Um Rückschlüsse auf Umwandlungen der CPP ziehen zu können, wurden von den kommerziell erhältlichen Pulvern Hydroxylapatit und Monetit ebenfalls Spektren im Reflexionsmodus aufgenommen. Bei Monetit lagen die charakteristischen Banden bei  $882\text{ cm}^{-1}$ ,  $902\text{ cm}^{-1}$ ,  $991\text{ cm}^{-1}$ ,  $1124\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1060\text{ cm}^{-1}$ . Im dritten Referenzzustand Hydroxylapatit wurden Banden bei  $1094\text{ cm}^{-1}$ ,  $1026\text{ cm}^{-1}$  sowie bei  $964\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Bei den drei Referenzzuständen wurde ein Rauschen zwischen den Wellenzahlen von  $1400 - 1700\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen.

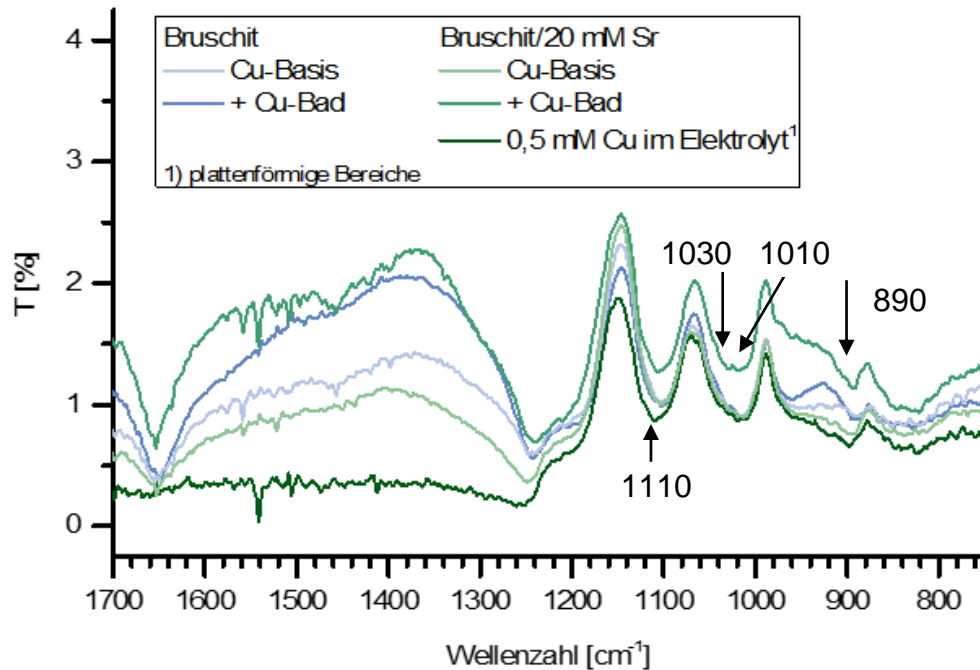


**Abbildung 8** FTIR-Spektren der Referenzzustände Bruschat, Hydroxylapatit und Monetit

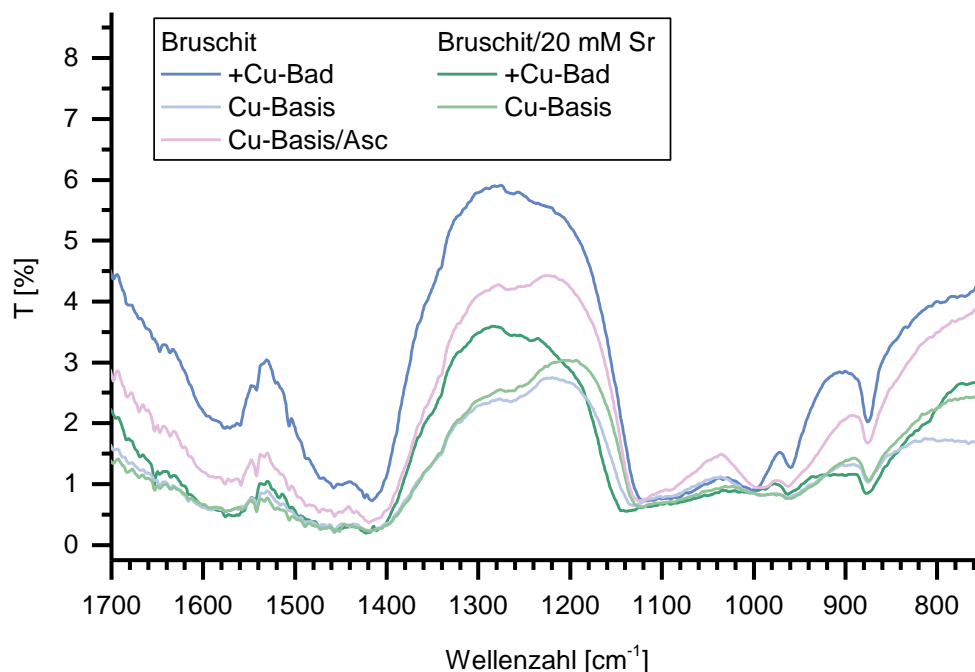
In Abbildung 9 sind Beschichtungszustände mit bzw. ohne Strontium mit einer Kupferbasisschicht als auch mit Kupferbadbehandlung ohne und mit anschließender NaOH-Behandlung dargestellt. In den Spektren der Beschichtungszustände ohne NaOH-Behandlung konnten charakteristische Banden bei  $890\text{ cm}^{-1}$ ,  $1010\text{ cm}^{-1}$ ,

1030  $\text{cm}^{-1}$  sowie bei 1110  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden. Erfolgte eine NaOH-Behandlung der Beschichtungszustände, so konnten in den Spektren Banden bei ca. 880  $\text{cm}^{-1}$ , 1420  $\text{cm}^{-1}$ , 1460  $\text{cm}^{-1}$ , 1540  $\text{cm}^{-1}$  sowie 1590  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen werden.

**A:**



**B:**

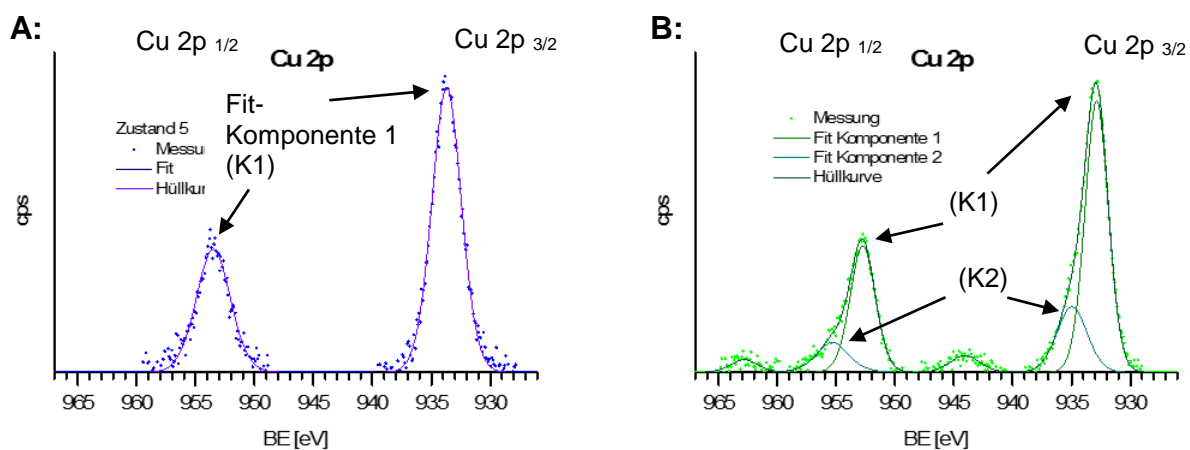


**Abbildung 9 IR-Spektren der spurenelementhaltigen CPP**

**A:** Ohne NaOH-Nachbehandlung der Beschichtungszustände. **B:** Mit NaOH-Nachbehandlung der Beschichtungszustände.

#### 5.1.4 Chemischer Status der Elemente sowie relative Quantifizierung der Elemente in der Beschichtungsoberfläche

Abbildung 10 stellt die XPS-Spektren der Cu 2p Region am Beispiel der CPP-Abscheidung mit Strontiumzusatz mit anschließender Kupferbadbehandlung mit (Abb.10, A) und ohne NaOH-Behandlung (Abb.10, B) gegenüber. Bei beiden Probenzuständen bestand der Cu 2p-Peak aus zwei gesplitteten Spin-Orbit-Komponenten: Cu 2p<sub>1/2</sub> bei einer Bindungsenergie von ca. 953 eV und Cu 2p<sub>3/2</sub> bei ca. 933 eV. In Abbildung 10 ist gut zu erkennen, dass sich die Peakform der Cu 2p Region einerseits aus einer Fit-Komponente (Abb.10, A, K1) oder andererseits aus zwei Fit-Komponenten mit einem Satelliten höherer Bindungsenergie (Abb.10, B, K1 und K2) zusammensetzte: für 2p<sub>3/2</sub> betrug die Bindungsenergie der Fit-Komponente 1  $932,8 \pm 0,1$  eV, der Fit-Komponente 2  $935,0 \pm 0,3$  eV sowie dem Satelliten  $944,3 \pm 0,1$  eV. Wurden die sCPP mit nachträglicher Kupferbadbehandlung sowie die CPP-Beschichtungen mit einer Kupferbasisschicht einer NaOH-Behandlung zugeführt, so wurde eine Bindungsenergie für Cu 2p<sub>3/2</sub> von  $932,8 \pm 0,1$  eV (K1) detektiert. Die gleiche Bindungsenergie für Cu 2p<sub>3/2</sub> wurde bei den unbehandelten Kupferbasisschichten bestimmt. Im Gegensatz dazu wurden bei den unbehandelten Probenzuständen mit nachträglicher Kupferbadbehandlung, mit abgeschiedener Kupferbasisschicht sowie Kupferzugabe im Elektrolyten Bindungsenergien für Cu 2p<sub>3/2</sub> von  $932,8 \pm 0,1$  eV (K1),  $935,0 \pm 0,3$  eV (K2) sowie  $944,3 \pm 0,1$  eV (Satellit) detektiert. Hierbei wurden 20-30 % des Kupfers in diesen Beschichtungen als zweiwertiges Kupfer abgeschieden.

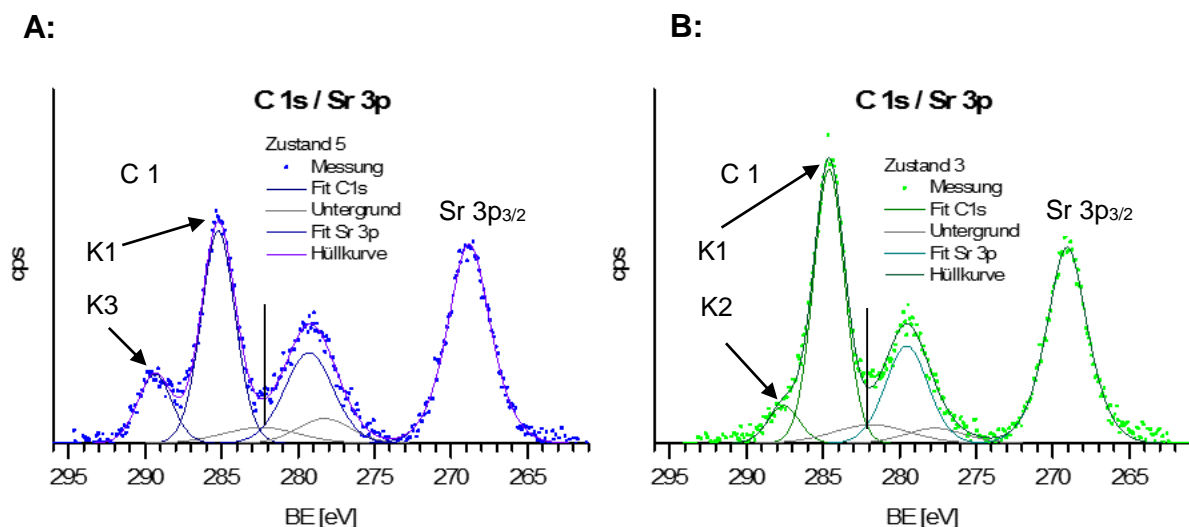


**Abbildung 10** XPS-Spektren der Cu 2p Region am Beispiel der sCPP mit und ohne NaOH-Bad

**A:** Mit NaOH-Behandlung. Cu 2p<sub>3/2</sub> bei einer Bindungsenergie von  $932,8 \pm 0,1$  eV. **B:** Ohne NaOH-Behandlung. Cu 2p<sub>3/2</sub> mit Bindungsenergien bei  $932,8 \pm 0,1$  eV (K1),  $935,0 \pm 0,3$  eV (K2) sowie dem Satelliten  $944,3 \pm 0,1$  eV

Abbildung 11 zeigt die sich überlappenden Spektren der C 1s und Sr 3p Region am Beispiel der strontiumhaltigen Beschichtungen mit anschließender Kupferbadbehandlung mit (Abb.11, A) und ohne NaOH-Behandlung (Abb.11, B). Die Peakform der C 1s-Region setzte sich aus einem Peak mit einem Maximum bei  $284,9 \pm 0,25$  eV (Fit-Komponente 1, Abb.11 K1) und einer Schulter bei  $287,7 \pm 0,2$  eV (Fit-Komponente 2, Abb.11 K2) zusammen. Auffällig war, dass bei allen NaOH-behandelten CPP-Beschichtungen eine dritte Fit-Komponente bei  $289,45 \pm 0,1$  eV (Fit-Komponente 3, Abb.11 K3) auftrat. Der Flächenanteil variierte bei der dritten Fit-Komponente an der Gesamtfläche der C 1s-Region zwischen ca. 25-40 %.

Die Sr 2p Region wurde in den spurenelementhaltigen CPP-Beschichtungen durch zwei Einzelpeaks bestimmt, die Sr 2p<sub>3/2</sub> bei einer Bindungsenergie von  $269,15 \pm 0,3$  eV und 2p<sub>1/2</sub> bei  $279,6 \pm 0,3$  eV zugeordnet werden können. Zusätzlich zu diesen Peaks konnte bei allen CPP-Beschichtungen eine einzelne Fit-Komponente (graue Fitkurve, Abb. 11) detektiert werden.



**Abbildung 11** XPS-Spektren der C 1s und Sr 3p Region am Beispiel der sCPP-Beschichtungen mit und ohne NaOH-Bad

**A:** Mit NaOH-Behandlung. Peakform der C 1s-Region bestand aus einem Maximum bei  $284,9 \pm 0,25$  eV und einer Schulter bei  $287,7 \pm 0,2$  eV. **B:** Ohne NaOH-Behandlung. Peakform setzte sich aus einer dritten Komponente bei  $289,45 \pm 0,1$  eV zusammen. Gestrichelte Linie trennt die sich überlappende C 1s / Sr 3p-Region. K1: Komponente 1, K2: Komponente 2, K3: Komponente 3

Die höchste gemessene Konzentration an Kupfer in der oberflächennahen Beschichtung von ca. 5-10 nm wurde bei dem Referenzzustand strontiumhaltiger

Bruskit mit Kupfer-Zugabe im Elektrolyten mit 3,31 Atomprozent (Atom%) gemessen. Deutlich geringere Atomprozent an Kupfer wurden in den CPP mit nachträglicher Kupferbadbehandlung sowie den Beschichtungszuständen mit einer Kupferbasisschicht in der Größenordnung von 0,36 - 1,57 Atom% (Kupferbadbehandlung) und 0,27 - 0,93 Atom% (Kupferbasisschicht) gemessen. Die ermittelten Atomprozent an Strontium in den Beschichtungsoberflächen waren ungefähr in der Größenordnung der Atomprozent an Kupfer: Kupfer-Zugabe im Elektrolyten mit 1,65 Atom%, Kupferbasisschicht mit 0,38 - 1,31 Atom%, Kupferbadbehandlung mit 0,34 - 1,77 Atom%. Auffällig war, dass in den NaOH-behandelten Beschichtungszuständen deutlich geringere Konzentrationen an Kupfer- sowie an Strontiumionen von ca. 50 - 80 % in Bezug auf die entsprechenden Zustände vor NaOH-Behandlung quantifiziert wurden. Mit nachträglicher NaOH-Behandlung der Beschichtungszustände wurden Natrium mit 6,5 - 13,4 Atom% sowie Fluor mit 0,08 - 2,63 Atom% detektiert.

## **5.2 Freisetungsverhalten der abgeschiedenen Beschichtungen bei Inkubation in simulierter Körperflüssigkeit**

### **5.2.1 Belegungsdichte an Kalzium -, Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation**

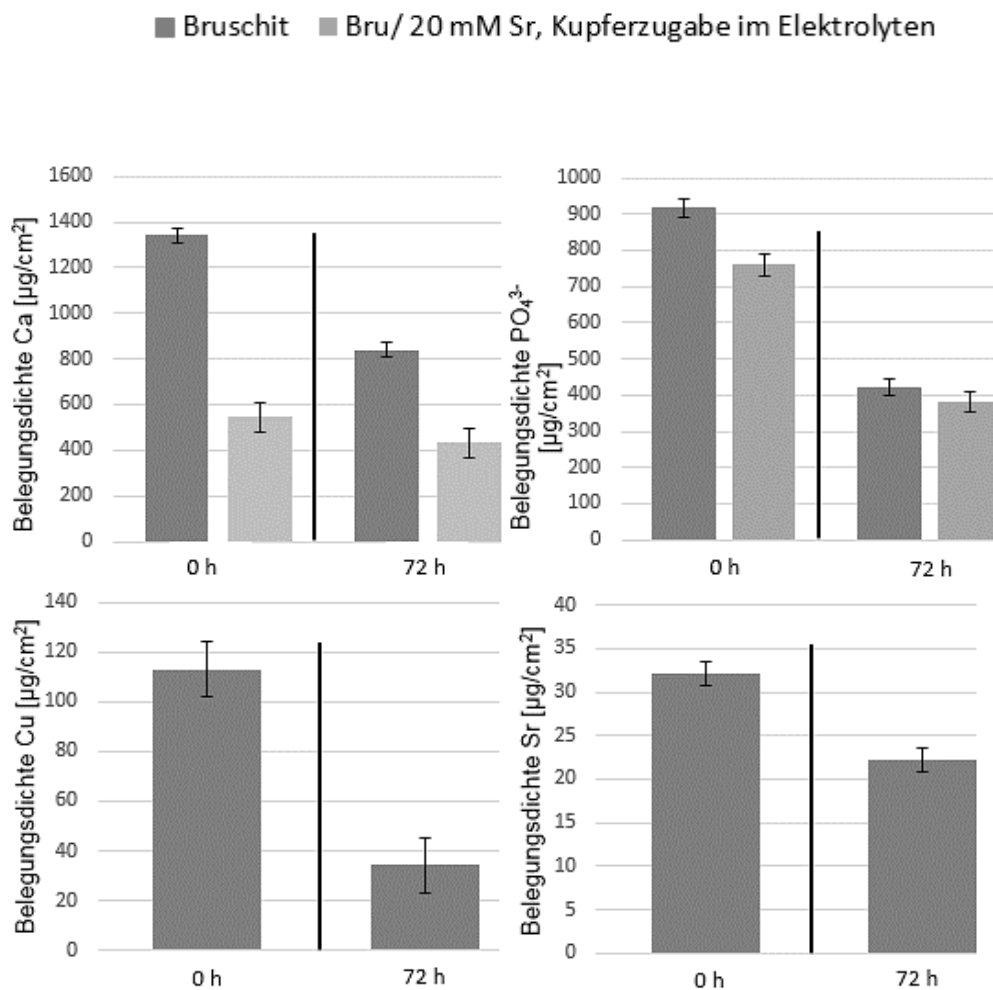
Nachfolgend werden die Schichtmassen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer-, Strontiumionen in den aufgelösten Beschichtungen nach den Abscheidungen und nach Beendigung der Inkubation jeweils für die drei Immobilisierungsmethoden von Kupferionen gegenüber dargestellt.

#### **5.2.1.1 Referenzzustände Bruskit und Kupferzugabe im Elektrolyten zur CPP-Abscheidung**

In der Abbildung 12 sind die Belegungsdichten an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen der Beschichtungen direkt nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation dargestellt.

Beim Beschichtungszustand Bruskit, in dessen Beschichtungsoberfläche keine Spurenelemente integriert wurden, lagen die Belegungsdichten an Kalzium und an Phosphat nach Inkubation in Tas-SBF deutlich unter den Belegungsdichten der Ausgangsproben in der Größenordnung von jeweils ca. 50 % der Ausgangsbelegungsdichte.

Hingegen sanken beim Probenzustand mit Kupferzugabe im Elektrolyten die Belegungsdichten an Kalzium nur um ca. 20 %, während die Belegungsdichte an Phosphat ca. 50 % der Ausgangsbelegungsdichte betrug. Nach dreitägiger Inkubation in serumhaltiger Tas-SBF wurden nur noch geringe Belegungsdichten an Kupfer im Bereich von ca. 30 % sowie an Strontium von ca. 35 % der initial immobilisierten Belegungsdichte an Kupfer und Strontium detektiert.



**Abbildung 12** Belegungsdichten an Kalzium -, Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Inkubation von Bruschit sowie CPP-Beschichtung mit Kupferzugabe im Elektrolyten im serumhaltigen Medium

### 5.2.1.2 Abscheidung von CPP-Beschichtungen auf Kupferbasisschicht

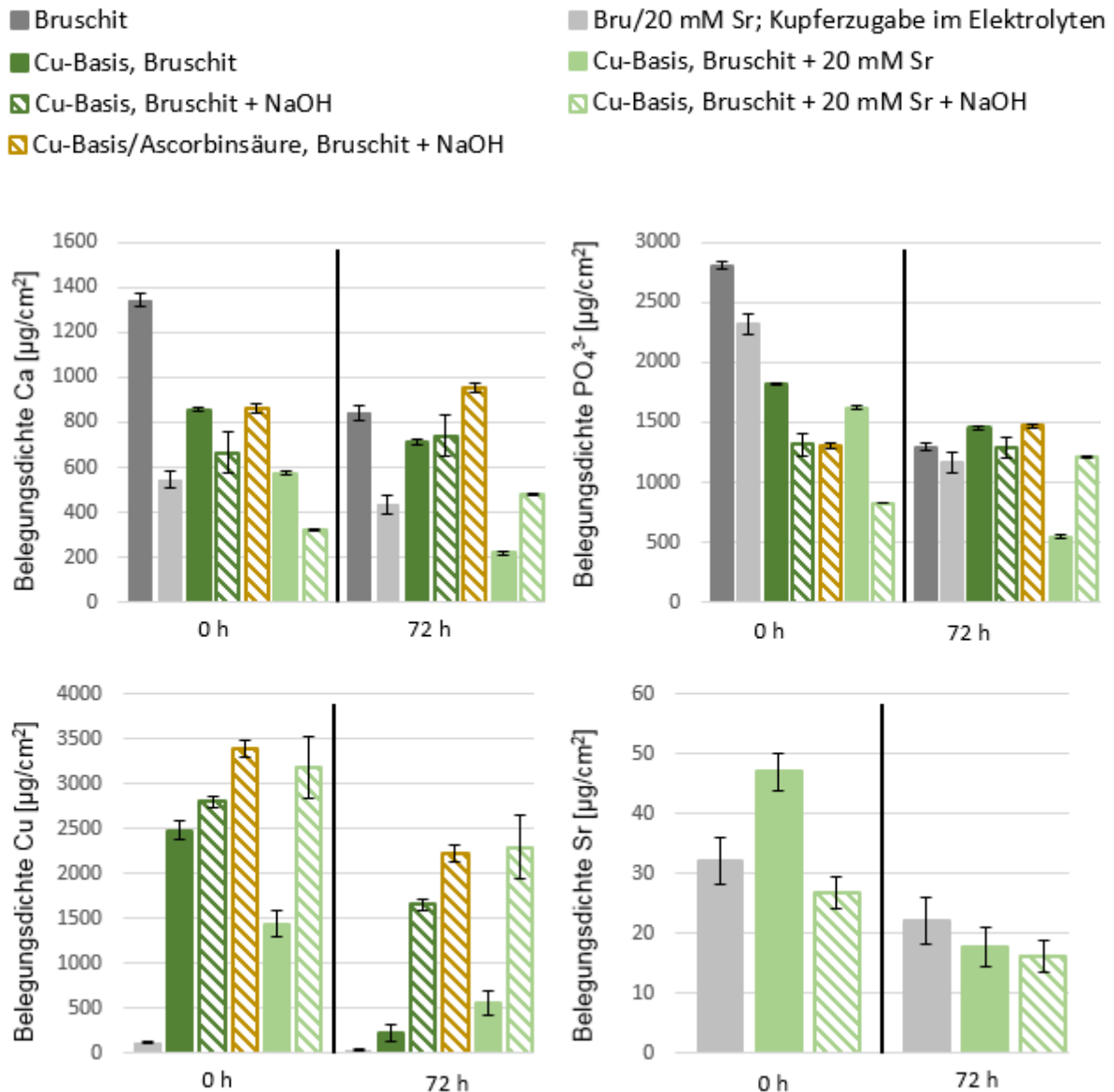
In Abbildung 13 sind die Belegungsdichten an Kalzium- Phosphat-, Strontium- und Kupferionen der CPP-Beschichtungen auf einer Kupferbasisschicht nach der Abscheidung und nach Beendigung der dreitägigen Inkubation im serumhaltigen Medium dargestellt.

Nach der dreitägigen Inkubation der strontiumfreien CPP auf einer Kupferbasisschicht im Inkubationsmedium sanken die Belegungsdichten an Kalzium um ca. 17 % sowie an Phosphat um ca. 10 %. Im Gegensatz dazu lagen bei den strontiumhaltigen Beschichtungen, welche keiner weiteren NaOH-Nachbehandlung unterzogen worden, die Belegungsdichten an Kalzium und an Phosphat in der Größenordnung von ca. 65 % deutlich unter denen der Ausgangsproben.

Erfolgte nach der elektrochemischen Abscheidung der Beschichtung eine NaOH-Behandlung, so blieben nach Beendigung der Inkubation in der serumhaltigen Tas-SBF bei der strontiumfreien Beschichtung die Belegungsdichten an Kalzium und an Phosphat nahezu konstant. Währenddessen wurden beim Probenzustand mit Strontiumzusatz jeweils ca. 48 % höhere Belegungsdichten der initial immobilisierten Belegungsdichten an Kalzium und an Phosphat detektiert: von 320 auf 475  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Kalzium) sowie von 830 auf 1215  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Phosphat).

Sowohl bei den strontiumfreien als auch den strontiumhaltigen Beschichtungen, bei denen keine NaOH-Nachbehandlung nach der Abscheidung durchgeführt wurden, konnten nach der dreitägigen Inkubation in Tas-SBF nur noch eine geringe Belegungsdichte an Kupfer im Bereich von 9 - 40 % der initial immobilisierten Kupfermenge detektiert werden. Wurden dieselben Probenzustände mit NaOH behandelt, so lagen die verbliebenen Kupfermengen dagegen bei 60 - 72 %.

Am Ende der dreitägigen Inkubation im serumhaltigen Medium lag bei der Beschichtung mit Strontiumzusatz, welche keine NaOH-Nachbehandlung unterzogen wurde, die Belegungsdichte an Strontium ca. 65 % unter der Ausgangsbelegungsdichte. Wurde bei demselben Probenzustand eine NaOH-Nachbehandlung durchgeführt, so wurden nur ca. 61 % der initial immobilisierten Belegungsdichte an Strontium am Ende der Inkubation in serumhaltiger Tas-SBF detektiert.



**Abbildung 13** Belegungsdichten an Kalzium -, Phosphat -, Kupfer - und Strontiumionen nach Abscheidung und nach Inkubation im serumhaltigen Medium der CPP-Beschichtung auf Kupferbasisschicht

### 5.2.1.3 Probeneinlagerung in Kupferbad

Abbildung 14 stellt die Belegungsdichten an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen der CPP-Beschichtungen, die nachträglich in einem Kupferbad behandelt wurden, nach der Abscheidung und am Ende der Inkubation in serumhaltiger Tas-SBF gegenüber.

Am Ende der Inkubation in Tas-SBF der strontiumfreien sowie der strontiumhaltigen Beschichtungen, bei denen keine weitere Nachbehandlung mit NaOH erfolgte, lagen die Belegungsdichten an Kalzium nahezu in der Größenordnung der



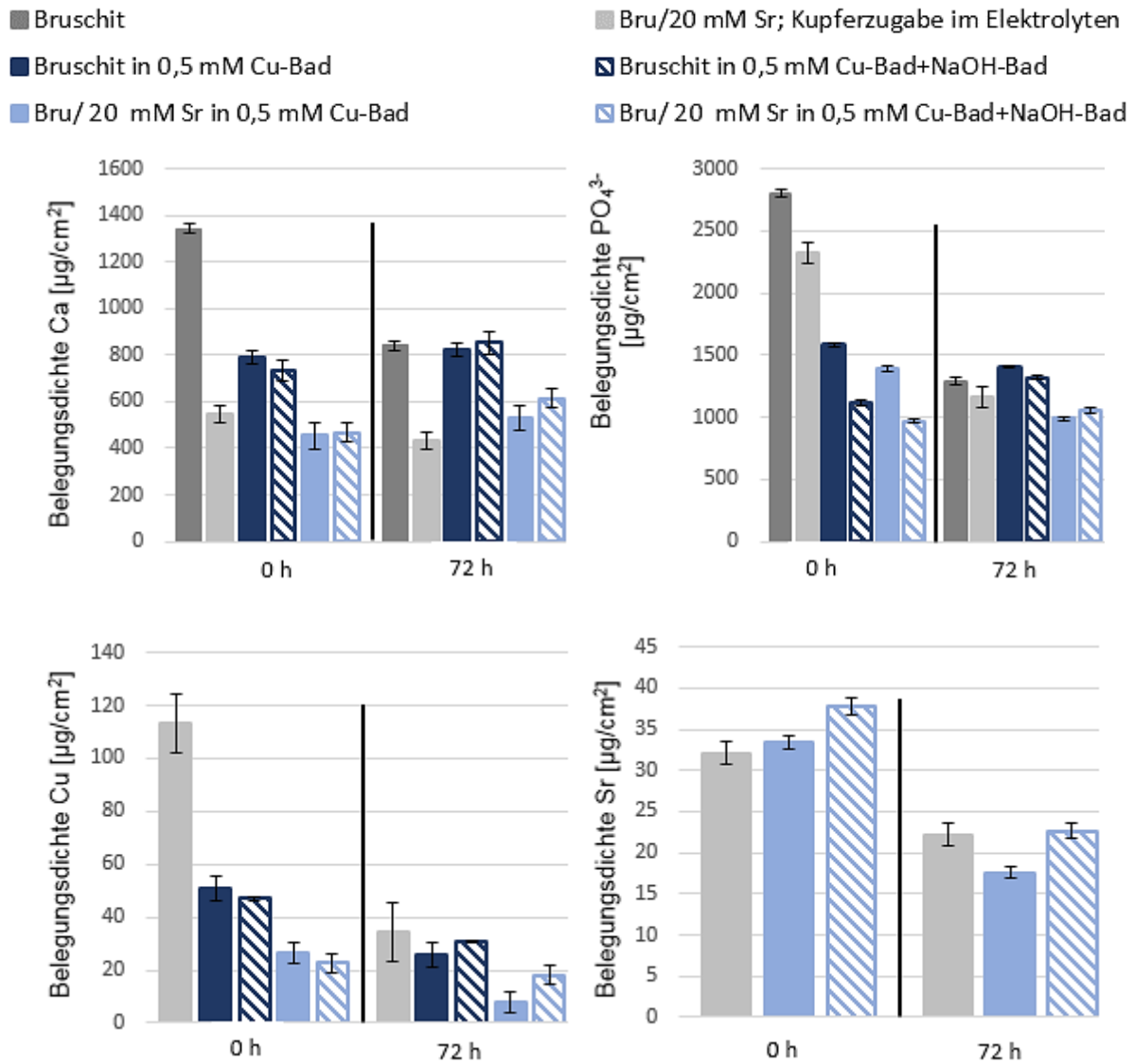
Ausgangsbelegungsdichten, während die Belegungsdichten an Phosphat deutlich unter den Belegungsdichten der Ausgangsproben in der Größenordnung von ca. 12-30 % lagen.

Wurde die strontiumfreie Beschichtung nachträglich mit NaOH behandelt, so erhöhten sich die Ausgangsbelegungsdichten an Kalzium und an Phosphat nahezu in der gleichen Größenordnung um ca. 16-18 % von ca. 730  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf ca. 850  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Kalzium) sowie von ca. 1120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf ca. 1320  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Phosphat). Im Gegensatz dazu erhöhten sich beim Probenzustand Brushit mit Strontiumzusatz mit anschließender NaOH-Behandlung die Ausgangsbelegungsdichten an Kalzium um ca. 32 % von ca. 460  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf ca. 615  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw. um ca. 8% von ca. 970  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf ca. 1050  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Phosphat).

Bei den sowohl strontiumfreien als auch den strontiumhaltigen Beschichtungen, bei denen keine Nachbehandlung mit NaOH durchgeführt wurden, konnten nur noch geringe Belegungsdichten im Größenbereich von 50-70 % der initial immobilisierten Belegungsdichten an Kupfer detektiert werden.

Im Gegensatz dazu lagen bei den Beschichtungen mit NaOH-Nachbehandlung die verbliebenen Kupfermengen bei 55-80 %.

Während der dreitägigen Inkubation in serumhaltiger Tas-SBF sanken sowohl bei den NaOH-behandelten Beschichtungen als auch bei den unbehandelten Beschichtungen die Belegungsdichten an Strontium nahezu in der gleichen Größenordnung um ca. 40-46 %.



**Abbildung 14** Belegungsdichten an Kalzium- Phosphat-, Kupfer-, Strontium und nach Abscheidung und nach Inkubation der CPP mit nachträglicher Kupferbadbehandlung

## 5.2.2 Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen in der Inkubationslösung

### 5.2.2.1 Referenzzustände Bruschit und Kupferzugabe im Elektrolyten zur CPP-Abscheidung

In Abbildung 15 sind die Konzentrationen an Kalzium- und Phosphationen des Referenzzustandes Bruschit sowie zusätzlich die Konzentrationen der Spurenelemente Kupfer und Strontium in der Beschichtung mit Kupferzugabe im Elektrolyten dargestellt. Bei dem Probenzustand Bruschit erhöhte sich nach 24-stündiger Inkubation im serumhaltigen Medium die Konzentration an Kalzium im Medium um ca. 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Bis zur Beendigung der Inkubation dieses

Probenzustandes nivellierte sich die Konzentration an Kalzium in der Größenordnung der Kontrollwerte. Im Gegensatz dazu entzog der strontiumhaltige Referenzzustand Kalzium aus dem Inkubationsmedium in der Größenordnung von ca. 40 µg/ml, jedoch erhöhten sich bis zur Beendigung der Inkubation die Konzentrationen an Kalzium im Inkubationsmedium um jeweils ca. 20 µg/d.

Während der dreitägigen Inkubation beider Referenzzustände im Inkubationsmedium erhöhten sich die Konzentrationen an Phosphat kontinuierlich um jeweils ca. 50-55 µg/d. (Referenzzustand Kupferzugabe) und um ca. 10 µg/d (Bruschi).

Die höchsten detektierten Konzentrationen an Kupfer und an Strontium wurden jeweils nach 24-stündiger Inkubation im Inkubationsmedium gemessen: die freigesetzten Kupfer-bzw. Strontiumkonzentrationen entsprachen ca. 89,5 % an initial immobilisierter Kupfermenge sowie ca. 77 % an initial immobilisierter Strontiummenge (s. Anhang 3). Allerdings nahmen die Konzentrationen der Kupfer- und Strontiumionen deutlich bis zur Größenordnung zum Verlauf der Kontrollwerte bis zur Beendigung der Inkubation dieser Beschichtungszustände ab.

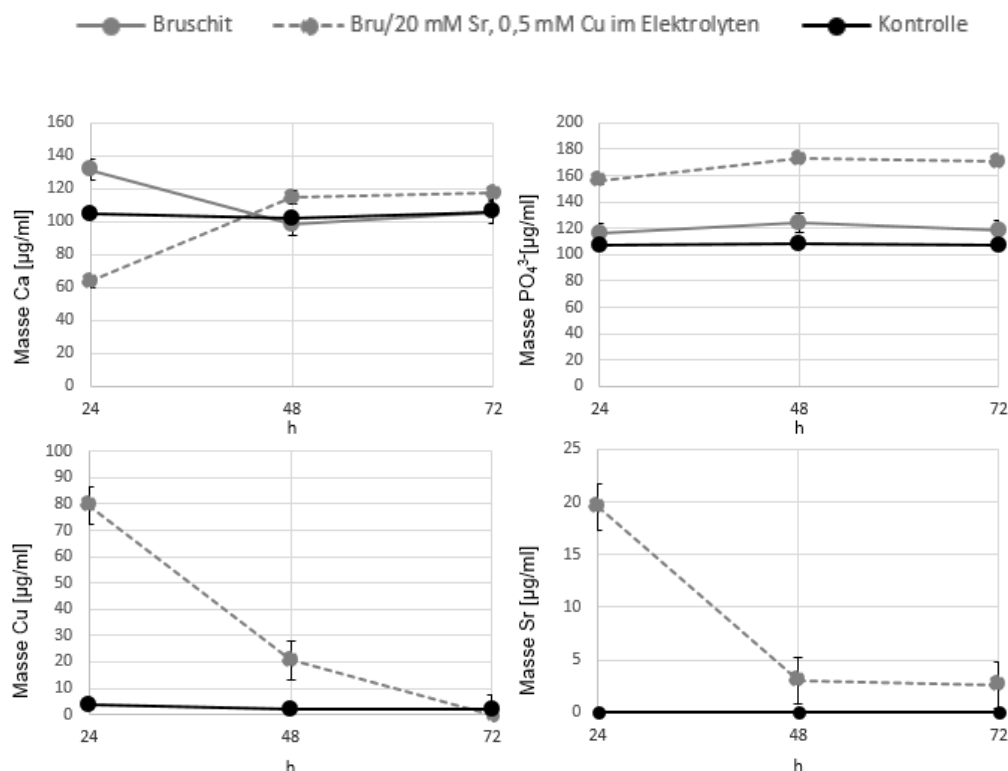


Abbildung 15

**Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen im serumhaltigen Inkubationsmedium von Bruschi und CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten**

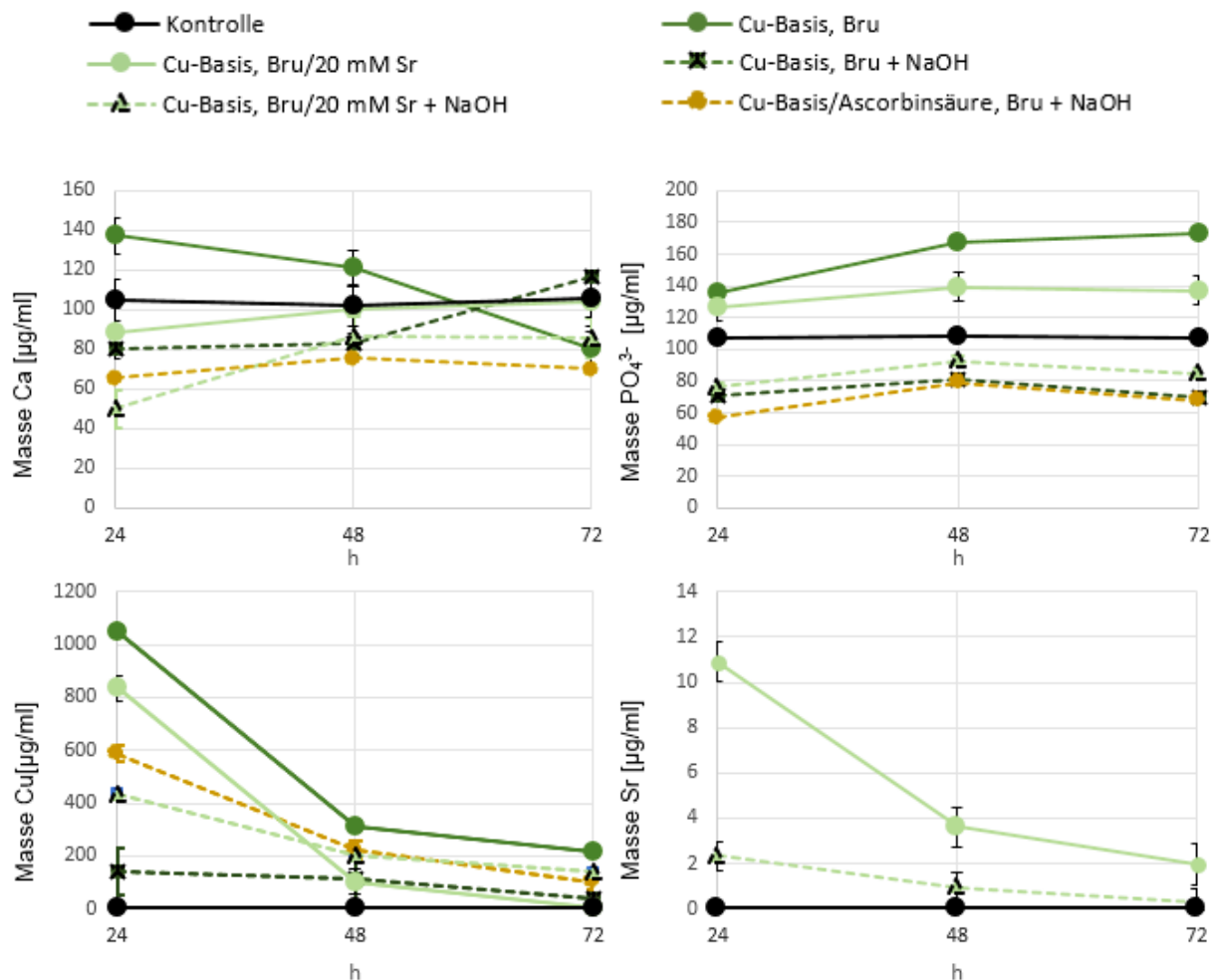
### 5.2.2.2 Abscheidung von CPP-Beschichtungen auf Kupferbasisschicht

In Abbildung 16 ist der Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen während der dreitägigen Inkubation in serumhaltigem Medium der Probenzustände CPP-Beschichtungen auf einer Kupferbasisschicht dargestellt.

Ohne den Zusatz von Strontium im Abscheidungsprozess der CPP erhöhte sich die Konzentration an Kalzium im Inkubationsmedium um ca. 40 µg/ml, wobei im Verlauf der Inkubation die Konzentrationen an Kalzium im Inkubationsmedium um ca. 20 µg/ml unter den Kontrollwerten sanken. Wurden die CPP mit Strontiumzusatz auf einer Kupferbasisschicht abgeschieden, so band diese Beschichtung ab dem zweiten Tag der Inkubation Kalzium in der Größenordnung zum Verlauf der Kontrollwerte. Im Gegensatz dazu entzogen die NaOH-nachbehandelten Beschichtungen im Verlauf der Inkubation dem Inkubationsmedium in starkem Ausmaß Kalzium in der Größenordnung von ca. 30-100 µg/ml sowie Phosphat von ca. 20-40 µg/ml. Es zeigte sich, dass im Verlauf der Inkubation im serumhaltigen Medium die CPP-Schicht auf in Anwesenheit von Ascorbinsäure erhaltener Kupferbasisschichten im Vergleich zum ascorbinfreien Beschichtungsprozess Phosphat nahezu in der gleichen Größenordnung aufnahm. Nach 24-stündiger Inkubation im serumhaltigen Medium wurde wie bereits beim Referenzzustand im Kapitel 5.2.2.1 beschrieben, die höchsten gemessenen Konzentrationen an Kupfer- und Strontiumionen im Inkubationsmedium detektiert: ohne NaOH-Behandlung wurde beim Bruschi ca. 54 % der initial immobilisierten Kupfermenge sowie mit Strontiumzusatz jeweils ca. 74 % der initial immobilisierten Kupfer- und Strontiummenge (s. Anhang 3) detektiert. Ab dem zweiten Inkubationstag im serumhaltigen Medium wurden bei den strontiumfreien Beschichtungen kontinuierlich geringere Konzentrationen an Kupferionen in der Größenordnung von ca. 16 % der initial immobilisierten Kupfermenge am Inkubationstag 2 und ca. 11 % am Tag 3 im Medium gemessen. Im Gegensatz dazu wurden ab dem zweiten Inkubationstag bei den Beschichtungen mit Strontiumzusatz geringere Kupferkonzentrationen im Medium gemessen: ca. 9 % der initial immobilisierten Kupfermenge am Tag 2 und ca. 0,5 % am Tag 3. Der Verlauf der Strontiumkonzentration im Inkubationsmedium war zum Konzentrationsverlauf der Kupferkonzentration im Medium ähnlich: am Inkubationstag 1 29,5 %, am Tag 2 9,7 % und am Tag 3 5,3 % (s. Anhang 3).

Wurden die Beschichtungszustände hingegen mit NaOH nachbehandelt, so wurden in den Inkubationslösungen nach den ersten 24 h deutlich geringere Konzentrationen

an Kupfer detektiert: bei den strontiumfreien Beschichtungen ca. 6,4 % bzw. bei einer Kupferbasisschicht mit Anwesenheit von Ascorbinsäure 22 % der initial immobilisierten Kupfermenge. Mit Strontiumzusatz in der CPP-Beschichtung wurden am ersten Inkubationstag ca. 17 % der initial immobilisierten Kupfermenge sowie ca. 29,5 % der initial immobilisierten Strontiummenge im Inkubationsmedium gemessen. (s. Anhang 3). Bei den NaOH-behandelten Beschichtungen wurde ebenfalls die kontinuierliche Abnahme der gemessenen Konzentrationen an Kupfer und Strontium ab dem zweiten Inkubationstag in der Größenordnung von ca. 5-8 % der initial immobilisierten Kupfermenge (Tag 2) bzw. ca. 4,5 % der initial immobilisierten Strontiummenge (Tag 2) festgestellt. Am dritten Inkubationstag wurden nur noch 2-5,5 % der initial immobilisierten Kupfermenge bzw. ca. 1,2 % der initial immobilisierten Strontiummenge nachgewiesen (s. Anhang 3).



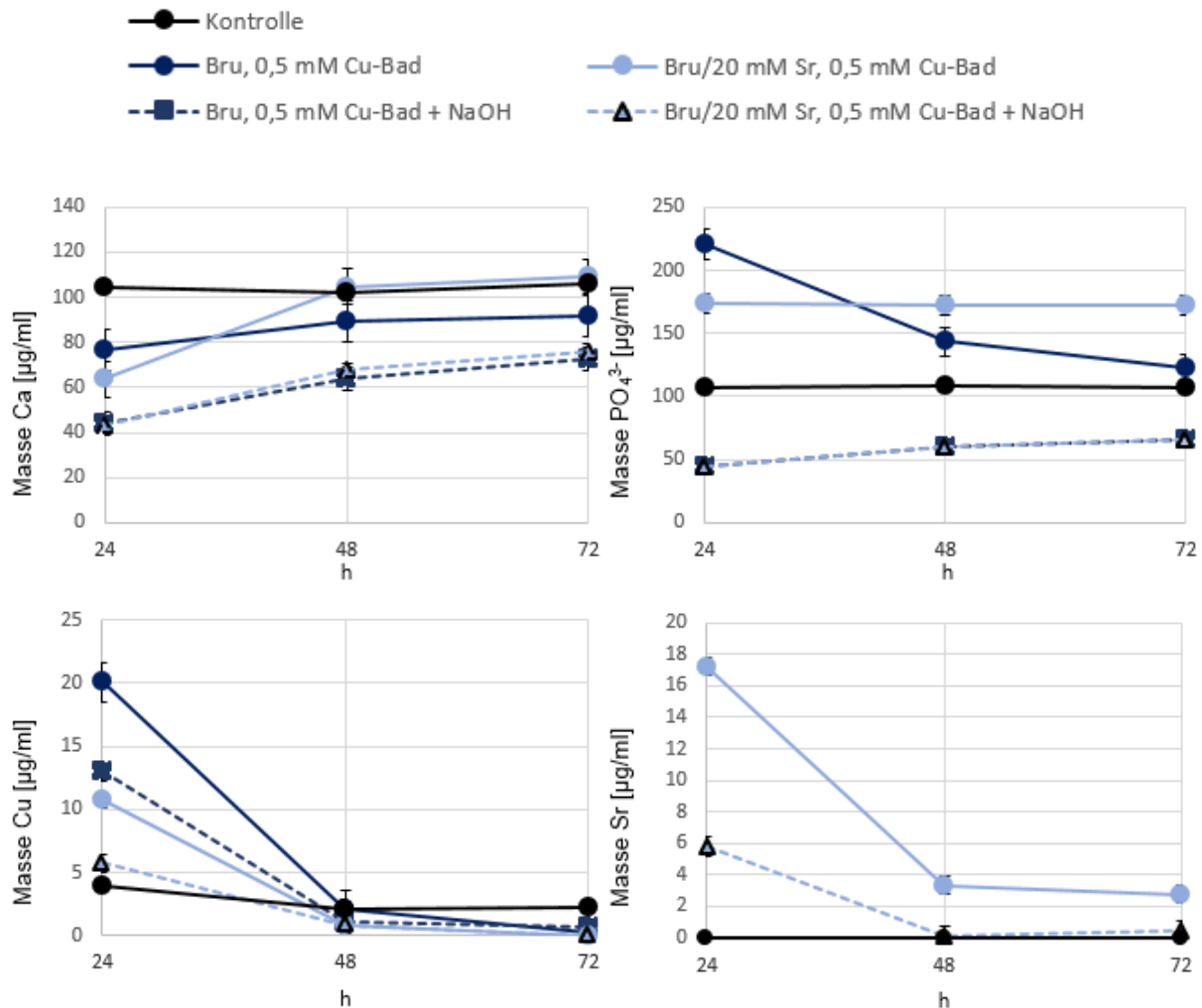
**Abbildung 16** Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen im serumhaltigen Medium der CPP auf Kupferbasisschicht

### 5.2.2.3 Probeneinlagerung in Kupferbad

Abbildung 17 stellt den Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen nach dreitägiger Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium der CPP-Beschichtungen mit nachträglicher Kupferbadbehandlung dar. Die Beschichtungen mit und ohne Strontium, die keiner weiteren Nachbehandlung zugeführt wurden, banden im Verlauf der dreitägigen Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium Kalzium in den nahezu gleichen Größenordnungen von ca. 40 µg/ml. Währenddessen setzten diese Beschichtungen Phosphat in der Größenordnung von ca. 195-225 µg/ml im Verlauf der Inkubation frei.

Im Gegensatz dazu entzogen im Verlauf der Inkubation alle NaOH-nachbehandelten strontiumfreien und strontiumhaltigen Beschichtungen nahezu im gleichen, starken Ausmaß Kalzium und Phosphat im Bereich von ca. 170 µg/ml (Kalzium) sowie ca. 160 µg/ml Phosphat.

Nach 24-stündiger Inkubation der strontiumfreien CPP-Beschichtung, welcher keiner weiteren NaOH-Behandlung zugeführt wurde, wurde die höchste gemessene Konzentration an Kupfer im Bereich von ca. 50 % der initial immobilisierten Kupfermenge im Inkubationsmedium detektiert. Mit Strontiumzusatz in dem Beschichtungszustand betrug die Konzentration an Kupfer nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls ca. 51 % der initial immobilisierten Kupfermenge, obwohl im gleichen Zeitraum ca. 68 % der initial immobilisierten Strontiummenge im Inkubationsmedium detektiert wurden. Mit durchgeführter NaOH-Behandlung der CPP-Beschichtungen wurden wesentlich geringere Konzentrationen an Kupfer- und Strontiumionen im Medium nachgewiesen: bei den CPP mit und ohne Strontium wurden nur ca. 32-35 % der initial immobilisierten Kupfermenge sowie ca. 27 % der initial immobilisierten Strontiummenge im Inkubationsmedium detektiert (s. Anhang 3).



**Abbildung 17** Verlauf der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat-, Kupfer- und Strontiumionen im serumhaltigen Inkubationsmedium der in Kupferbad ausgelagerten Proben

### 5.2.3 Molare $\text{Ca}/\text{PO}_4^{3-}$ -Verhältnisse nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium

In der folgenden Tabelle 7 sind die molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der Beschichtungen nach der Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium gegenübergestellt.

Mit der Berechnung der molaren Kalzium und Strontium zu Phosphat sowie Kalzium und Kupfer zu Phosphat-Verhältnisse sollten die möglicherweise stattfindende Substitution des Kalziums im Kristallgitter der CPP durch Strontium und / oder Kupfer berücksichtigt werden. Jedoch konnten bei der Berechnung dieser molaren Verhältnisse nur marginale Unterschiede zwischen den berechneten molaren

Verhältnissen festgestellt werden (s. Anhang 4). Aus diesem Grund sind in Tabelle 7 nur die molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse dargestellt.

**Tabelle 7 Molare Ca/P-Verhältnisse nach Abscheidung und nach Inkubation**

		Probe	Molares Ca/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis nach Abscheidung	Molares Ca/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis am Ende der Inkubation
Referenz 1		Bruskit	1,13 ± 0,01	1,54 ± 0,02
Referenz 2 Kupferzugabe im Elektrolyten	Ohne NaOH- Bad	Bruskit / 20 mM Sr	0,55 ± 0,05	0,88 ± 0,02
Kupferbad- behandlung	Ohne NaOH- Bad	Bruskit	1,14 ± 0,02	1,40 ± 0,12
		Bruskit / 20 mM Sr	0,77 ± 0,06	1,27 ± 0,03
	Mit NaOH- Bad	Bruskit	1,55 ± 0,01	1,52 ± 0,04
		Bruskit / 20 mM Sr	1,13 ± 0,04	1,38 ± 0,03
Kupfer- basisschicht	Ohne NaOH- Bad	Bruskit	1,11 ± 0,01	1,16 ± 0,02
		Bruskit / 20 mM Sr	0,83 ± 0,07	0,92 ± 0,03
	Mit NaOH- Bad	Bruskit	1,24 ± 0,2	1,4 ± 0,23
		Ascorbinsäure + Bruskit	1,58 ± 0,09	1,54 ± 0,01
		Bruskit / 20 mM Sr	0,91 ± 0,05	0,93 ± 0,04



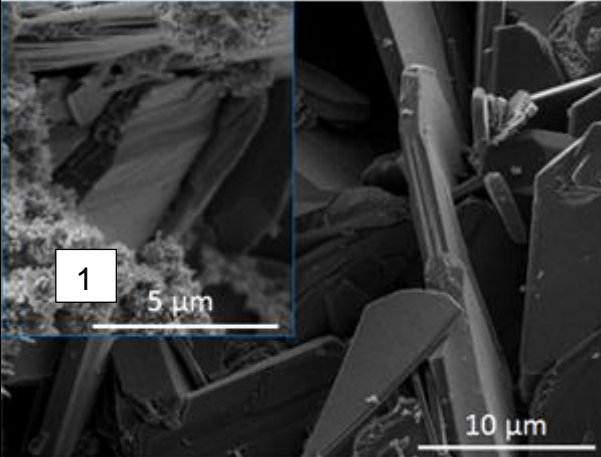
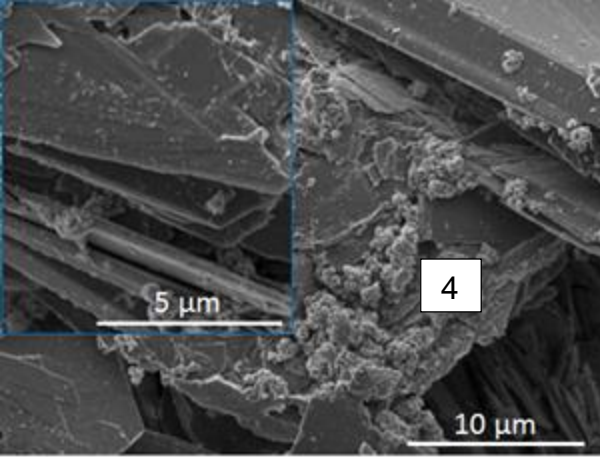
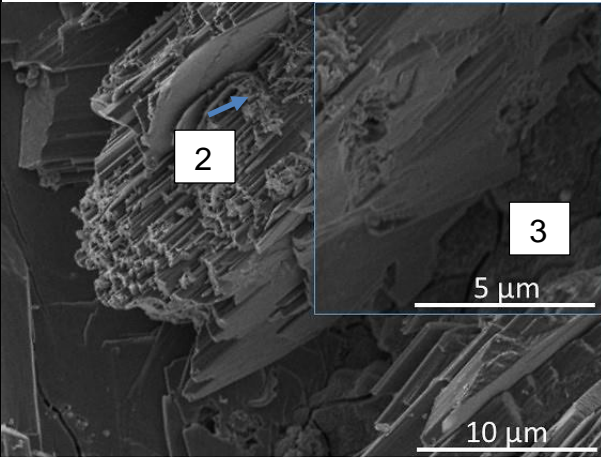
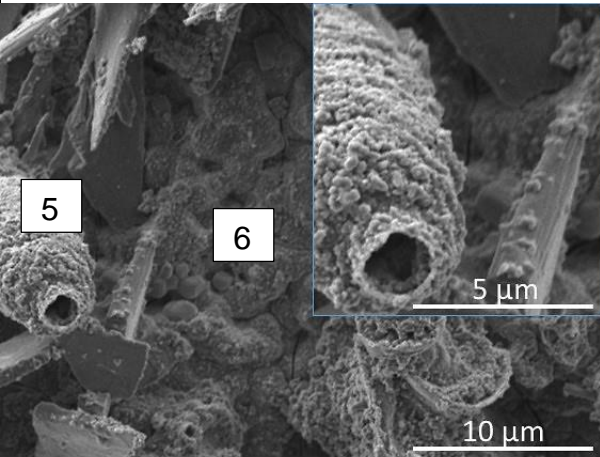
## **5.2.4 Morphologie von CPP-Beschichtung nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation**

### **5.2.4.1 Morphologie von Referenzzuständen Brushit und CPP-Beschichtungen mit Kupferzugabe im Elektrolyten**

Tabelle 8 stellt die Oberflächen der Brushitreferenz und der Beschichtungen mit Kupferzugabe im Elektrolyten nach Abscheidung und am Ende der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium gegenüber. Nach der Abscheidung der Brushitreferenz war diese Oberfläche geprägt von Brushitplatten sowie clusterförmig angeordneten globulären mit nadelförmiger Oberflächenstruktur versehenen Agglomeraten (Tab.8, 1). Im Gegensatz dazu waren direkt nach der Abscheidung auf der Oberfläche der CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten aufeinander gestapelte Kristalle mit auf den Kristallen aufgelagerten fadenförmigen Strukturen (Tab. 8, 2) sowie vereinzelt auf der Oberfläche verteilte kleine globuläre Agglomerate zu erkennen. Der Beschichtungsuntergrund dieses Probenzustandes war charakterisiert durch stellenweise auf der Oberfläche vorkommende größere globuläre Agglomerate (Tab. 8, 3) sowie Risse.

Im Ergebnis der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium veränderte sich die Oberflächenmorphologie beim Beschichtungszustand Brushit von ursprünglichen globulären Agglomeraten mit nadelförmiger Oberflächenstruktur zu globulären Agglomeraten mit kompakter Struktur (Tab. 8, 4). Währenddessen veränderte sich die Oberflächenmorphologie der strontiumhaltigen CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten nach Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium zu größeren, globulären Agglomeraten, die vollständig über die Oberfläche verteilt sowie am Beschichtungsgrund vorlagen (Tab. 8, 5 und 6). Die Plattenmorphologie dieser Beschichtung war stellenweise noch erkennbar. Weiterhin war diese Beschichtungsoberfläche geprägt von stellenweise auftretenden schornsteinartigen, mit globulären Agglomeraten überzogenen Strukturen.

**Tabelle 8** REM-Aufnahmen von den Oberflächen der Beschichtungen Bruschitreferenz sowie der CPP mit Kupferzugabe im Elektrolyten nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium

Beschichtung nach Abscheidung	Beschichtung nach Beendigung der Inkubation
<b>Bruschit</b> 	<b>Bruschit</b> 
<b>Bruschit / 20 mM Sr</b> 	<b>Bruschit / 20 mM Sr</b> 

#### 5.2.4.2 Morphologie von CPP-Beschichtungen auf Kupferbasisschicht

Tabelle 9 zeigt die Oberflächen der abgeschiedenen CPP-Beschichtungen auf einer Kupferbasisschicht mit und ohne NaOH-Nachbehandlung der CPP nach Abscheidung und am Ende der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium.

Die Oberfläche der strontiumfreien CPP, welcher keiner weiteren NaOH-Nachbehandlung zugeführt wurde, war geprägt von auf der Oberfläche ungleichmäßig angeordneten Kristallen sowie globuläre, in unterschiedlichen Größen abgeschiedenen Agglomeraten.

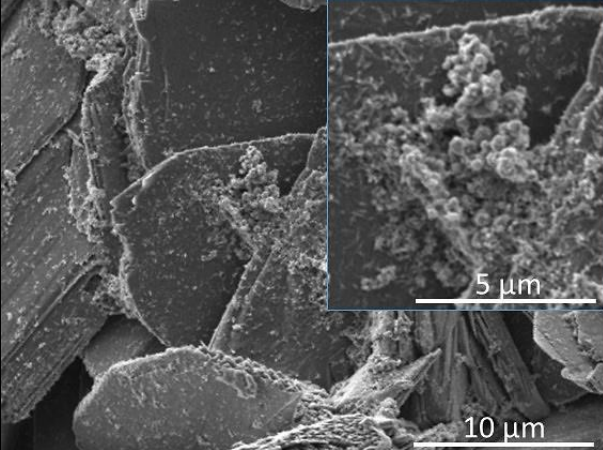
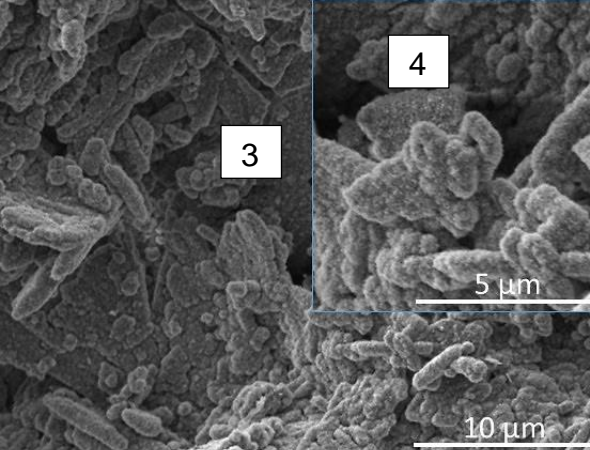
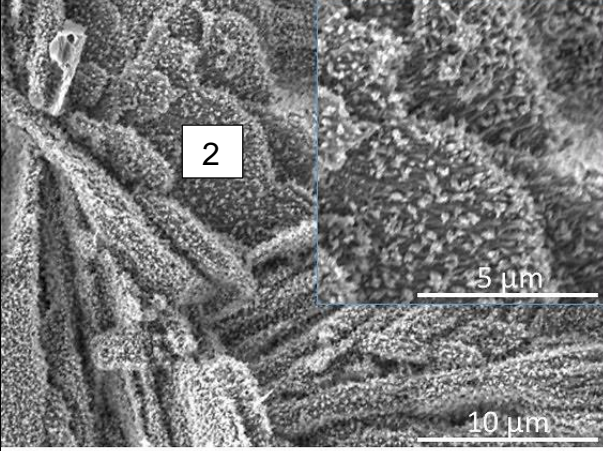
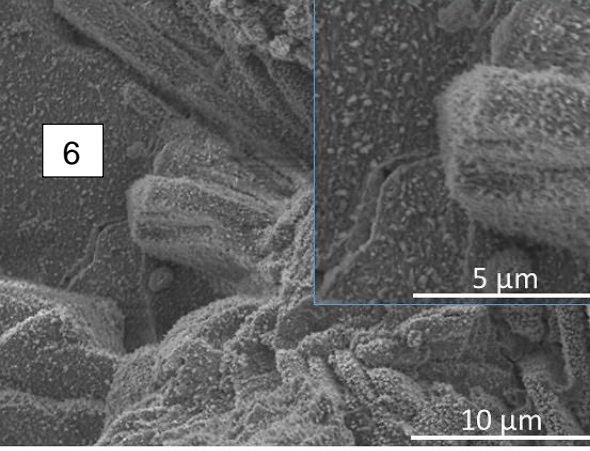
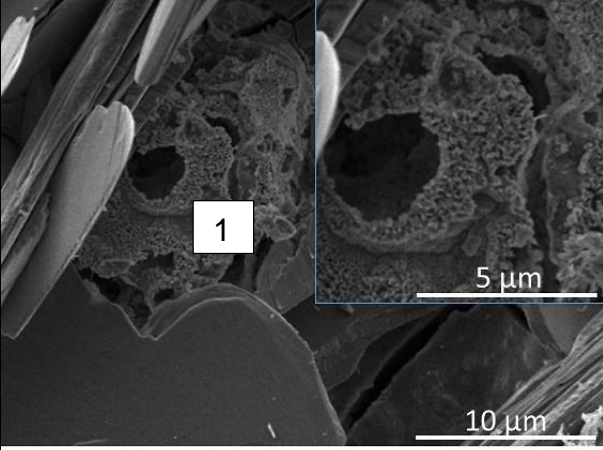
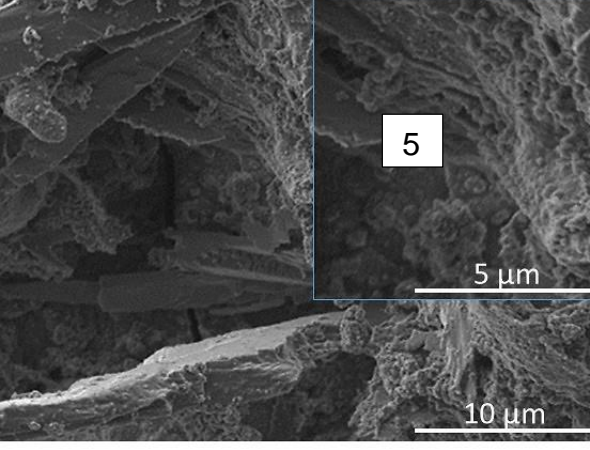
Mit Strontiumzugabe im Elektrolyten zeichnet sich die strontiumhaltige Beschichtungsoberfläche ohne NaOH-Nachbehandlung durch zwei unterschiedliche auftretende Morphologien auf: Kristalle und globuläre, zu kompakten Strukturen zusammengefasste Agglomerate (Tab. 9, 1).

Mit Auslagerung der sowohl strontiumfreien als auch strontiumhaltigen Beschichtungen in einem NaOH-Bad veränderten sich die plattenförmigen und aus globulären Agglomeraten bestehenden Oberflächenstrukturen zu feinen undefinierbaren Strukturen, die vollständig über die Oberflächen der Beschichtungen verteilt waren (Tab. 9, 2).

Nach der dreitägigen Inkubation der Beschichtungen im serumhaltigen Inkubationsmedium dominierten auf der strontiumfreien Beschichtungsoberfläche sowohl kleine globuläre Agglomerate (Tab. 9, 3) als auch große globuläre Agglomerate, die nahezu vollständig über die komplette Beschichtungsoberfläche verteilt waren (Tab. 9, 4). Im Gegensatz dazu war die Morphologie der strontiumhaltigen Beschichtungsoberfläche geprägt durch kleine globuläre Agglomerate, die in der Morphologie den Agglomeraten der strontiumfreien Beschichtung ähnlich waren und ebenfalls auf der kompletten Oberfläche verteilt vorlagen (Tab. 9, 5).

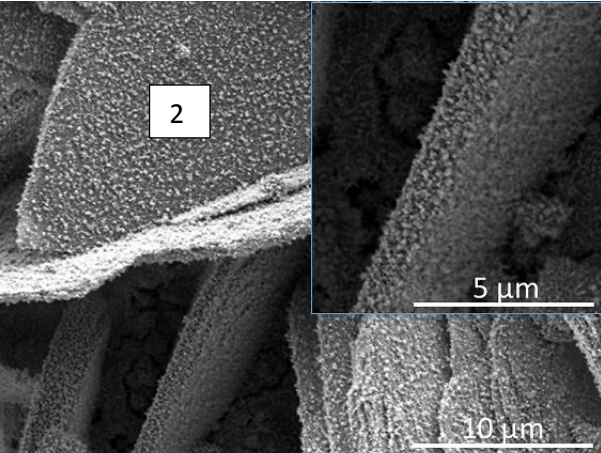
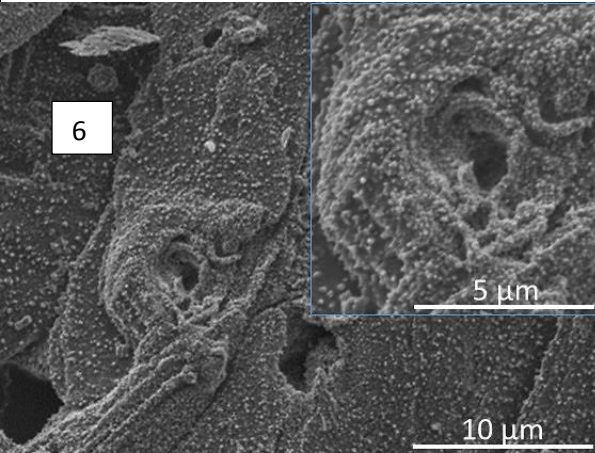
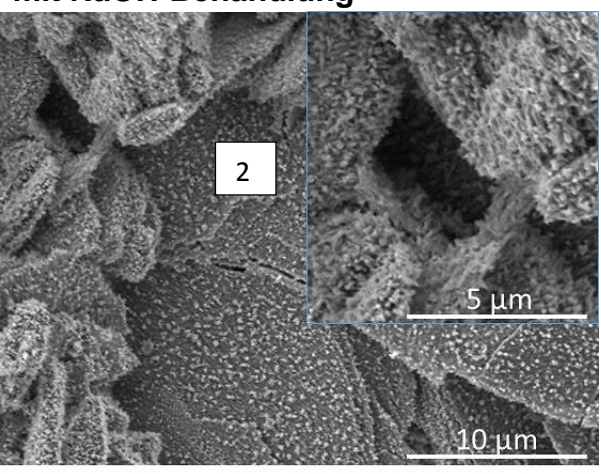
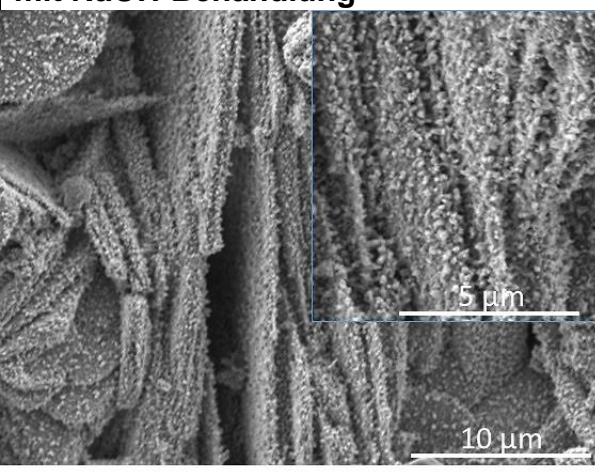
Wurden die strontiumfreien als auch die strontiumhaltigen Beschichtungen nachträglich mit einem NaOH-Bad behandelt, so blieben nach der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium auf diesen Beschichtungsoberflächen die feinen Strukturen, die auf der kompletten Oberflächen verteilt auftraten, im Vergleich zu den Ausgangsproben nahezu unverändert (Tab. 9, 6).

**Tabelle 9** REM-Aufnahmen von den Oberflächen der CPP auf Kupferbasis-schicht nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium

Beschichtung nach Abscheidung	Beschichtung nach Beendigung der Inkubation
<b>Brusshit</b>	<b>Brusshit</b>
	
<b>Brusshit mit NaOH-Behandlung</b>	<b>Brusshit mit NaOH-Behandlung</b>
	
<b>Brusshit / 20 mM Sr</b>	<b>Brusshit / 20 mM Sr</b>
	



**Tabelle 9 (Fortsetzung) REM-Aufnahmen von den Oberflächen der CPP auf Kupferbasisschicht nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium**

Beschichtung nach Abscheidung	Beschichtung nach Beendigung der Inkubation
Bruschart / 20 mM Sr mit NaOH-Behandlung	Bruschart / 20 mM Sr mit NaOH-Behandlung
	
Ascorbinsäure / Cu-Basis + Bruschart mit NaOH-Behandlung	Ascorbinsäure / Cu-Basis + Bruschart mit NaOH-Behandlung
	

#### 5.2.4.3 Morphologie von CPP-Schichten mit adsorbiertem Kupfer

In Tabelle 10 sind die Oberflächen der Beschichtungen mit adsorbiertem Kupfer nach Abscheidung und am Ende der dreitägigen Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium dargestellt. Die Morphologien der strontiumfreien sowie der strontiumhaltigen Beschichtungen mit nachträglicher Adsorption von Kupfer ähneln den bereits im Unterkapitel 5.2.4.2 beschriebenen Morphologien der CPP auf einer Kupferbasisschicht. Die Morphologie der Oberfläche der strontiumfreien Beschichtung mit adsorbiertem Kupfer war geprägt durch die für Bruschart charakteristischen Platten sowie vereinzelt auftretende globuläre Agglomerate. Mit

Strontiumzusatz in der Beschichtungsoberfläche nahm im Vergleich zur strontiumfreien Beschichtung der Anteil an globulären Agglomeraten ab und Kristalle dominierten das Erscheinungsbild.

Wurde ein Teil der Beschichtungszustände einer NaOH-Behandlung unterzogen, konnten auf den Oberflächen der strontiumfreien als auch der strontiumhaltigen Beschichtungen, wie bereits im Unterkapitel 5.2.4.2 dargelegt, gleichmäßig über die kompletten Oberflächen verteilte feine Strukturen beobachtet werden.

Im Ergebnis der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium dominierten in der strontiumfreien Beschichtungsoberfläche große globuläre Agglomerate, die die Oberfläche vollständig bedeckten (Tab. 10, 1). Mit Strontiumzusatz in der Beschichtung war diese Oberfläche geprägt von kleinen (Tab. 10, 2) sowie großen globulären Agglomeraten, die sich am Rand der Kristalle bildeten (Tab. 10, 3)

Nach der Inkubation der NaOH-behandelten Beschichtungszustände in serumhaltiger SBF veränderten sich die Morphologien der Oberflächen im Vergleich zu den Ausgangszuständen, die durch Oberflächen mit feinen Strukturen geprägt war, nur geringfügig.

**Tabelle 10** REM-Aufnahmen von den Oberflächen der Beschichtungen mit adsorbiertem Kupfer nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium

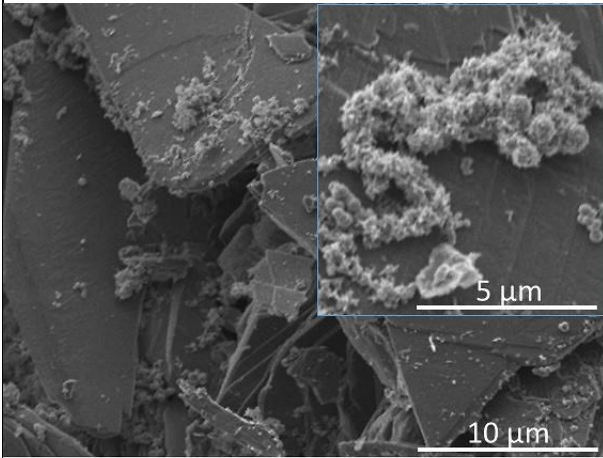
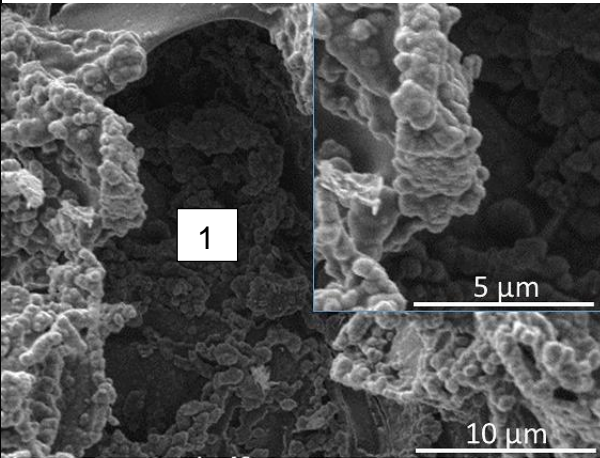
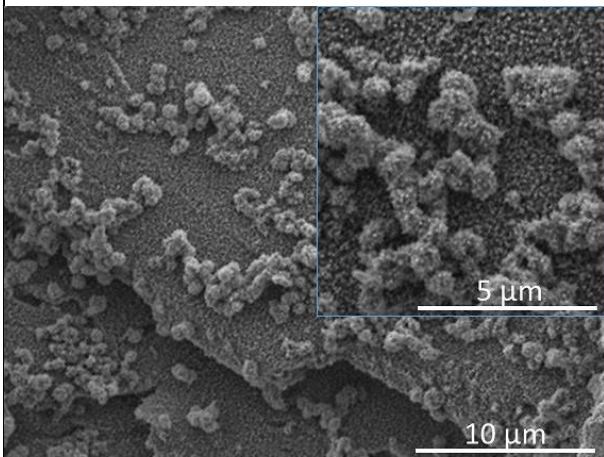
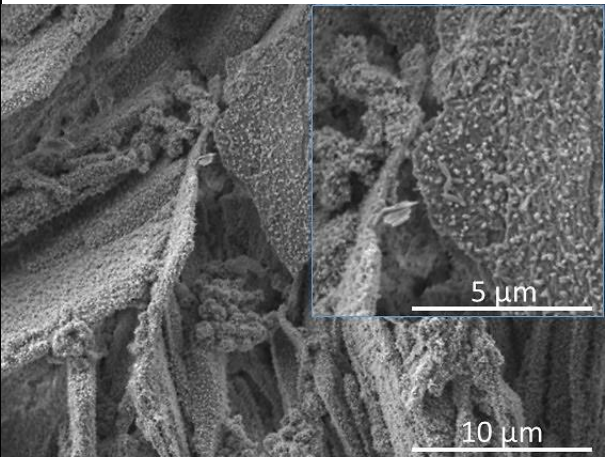
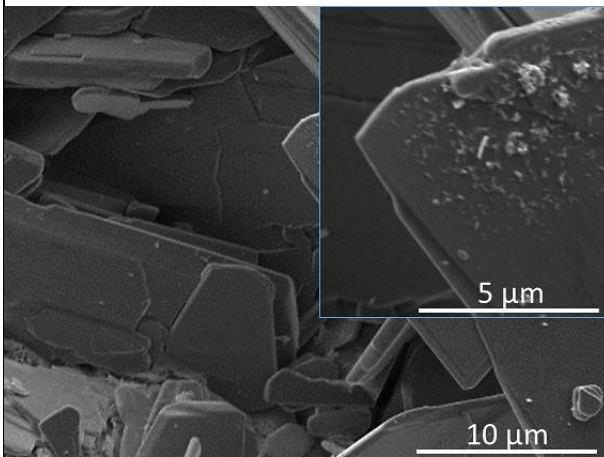
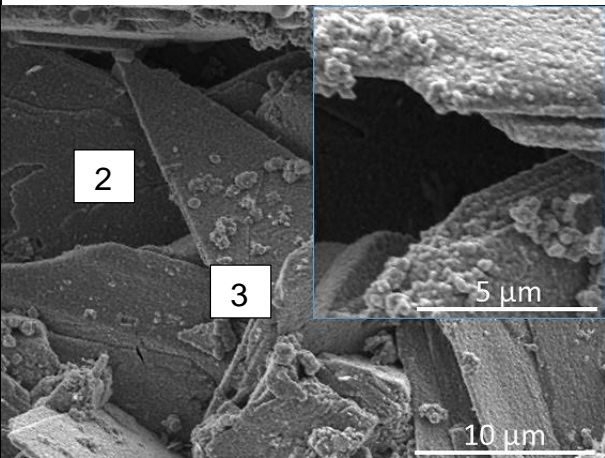
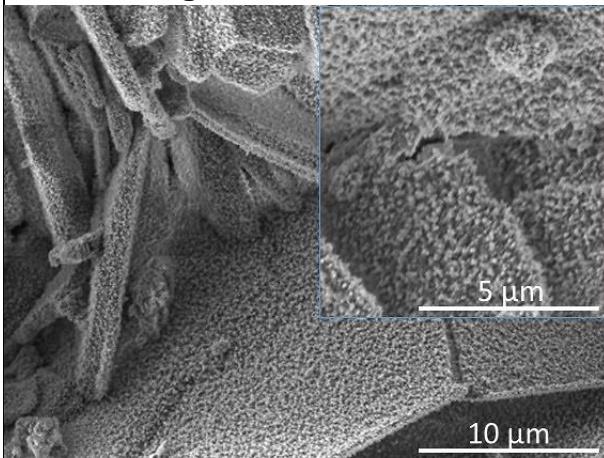
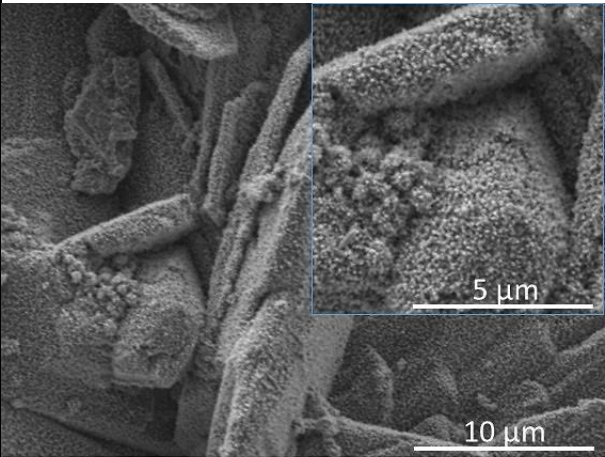
Morphologie nach Abscheidung	Beschichtung nach Beendigung der Inkubation
<b>Brusshit</b>	<b>Brusshit</b>
	



Tabelle 10 (Fortsetzung)

REM-Aufnahmen von den Oberflächen der Beschichtungen mit absorbiertem Kupfer nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium

Morphologie nach Abscheidung	Beschichtung nach Beendigung der Inkubation
<b>Bruschat mit NaOH-Behandlung</b>	<b>Bruschat mit NaOH-Behandlung</b>
	
<b>Bruschat / 20 mM Sr</b>	<b>Bruschat / 20 mM Sr</b>
	
<b>Bruschat / 20 mM Sr mit NaOH-behandlung</b>	<b>Bruschat / 20 mM Sr mit NaOH-behandlung</b>
	

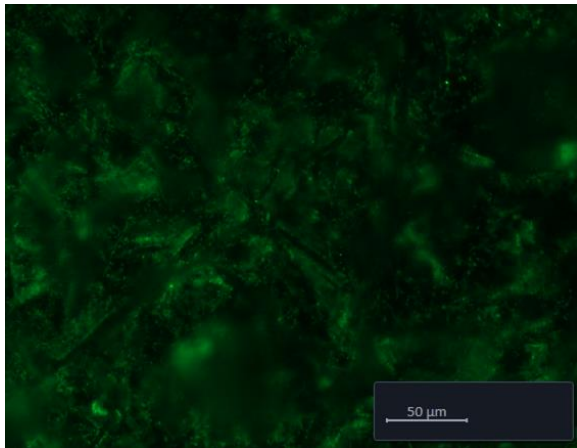
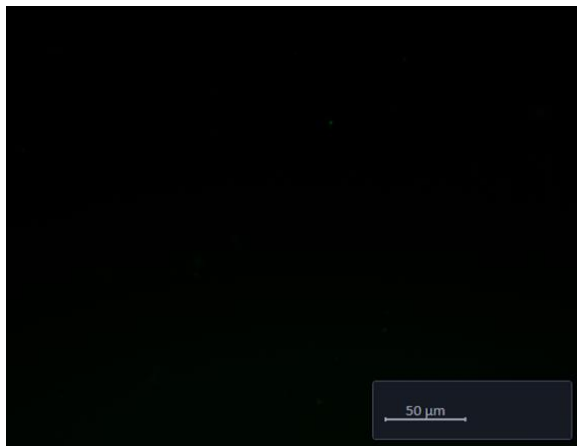
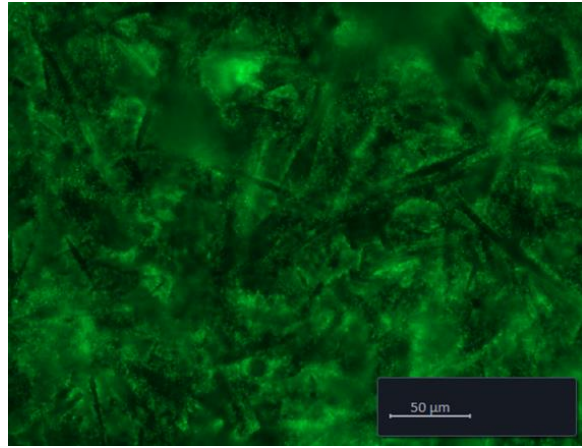
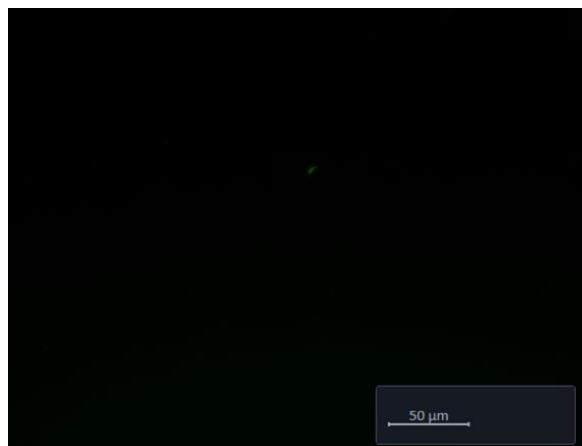
### **5.3 Einfluss der Belegungsdichten an Kupfer und Strontium sowie CPP auf Bakterienadhäsion an Beschichtungsoberflächen**

Das antimikrobielle Potential von Kupfer, welches zusätzlich zu Strontium in CPP integriert wurde, sollte anhand der Adhäsion eines Modellkeims (*E. coli* SM 2029) beurteilt werden. Als Referenzoberflächen dienten mit Bruschit sowie strontiumhaltigen Bruschit (20 mM Strontiumzusatz zum Elektrolyten) beschichtete Titanproben. Für die Integration des Kupfers wurde die Variante der Zugabe des Kupfers zum Elektrolyten gewählt, da für diesen Zustand eine initiale Kupferfreisetzung von 80 µg/ml nach 24 h sowie eine verminderte Freisetzung unter 20 µg/ml im weiteren Inkubationsverlauf ermittelt wurde. Kupferionen von mehr als 500 µM (entspricht 31,7 µg/ml), wie sie für den Zustand mit Kupferbasisschicht über einen Zeitraum von mehreren Tage bei Lagerung im Inkubationsmedium freigesetzt wurden, erwiesen sich in Vorversuchen mit Osteoklasten als zytotoxisch. Die Probenherstellung der kupferhaltigen Beschichtungszustände erfolgte entweder durch Kupferzugabe zum Ausgangselektrolyten (Cu 1) oder durch Zugabe einer konzentrierten Kupferlösung 10 Minuten nach Beginn des Abscheidungsprozesses (Cu 2). Für beide Varianten betrug die finale Kupferkonzentration 0,5 mM. An abgeschiedenen Kupfermassen wurde in den Beschichtungen mittels fotometrischer Tests ca.  $155 \pm 25 \text{ µg/cm}^2$  (Cu 1) sowie ca.  $114 \pm 35 \text{ µg/cm}^2$  (Cu 2) detektiert. Nach 17-stündiger Inkubationszeit dieser Beschichtungszustände im Inkubationsmedium wurden Konzentrationen an Kupferionen im Bereich von ca.  $18,42 \pm 1,86 \text{ µg/ml}$  (Cu 1) sowie  $14,13 \pm 2,8 \text{ µg/ml}$  (Cu 2) detektiert.

#### **5.3.1 Fluoreszenzmikroskopie von CPP-Beschichtungen nach Besiedlung mit *E.coli* SM 2029**

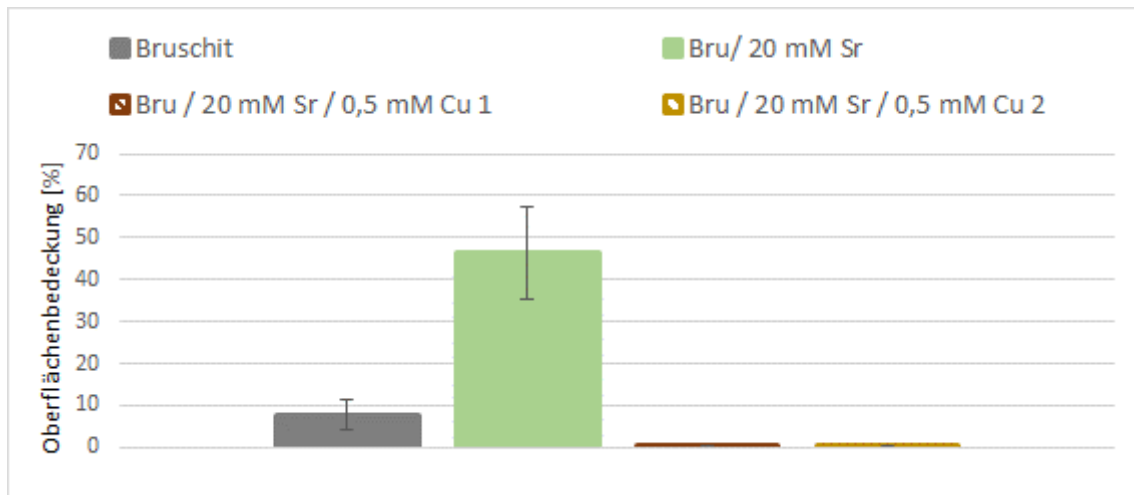
Die Abbildung 18 zeigt die adhärenenten Bakterien nach 17 h Inkubation bei 37 °C nach Inokulation von  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml Biofilmmedium. Bei den kupferhaltigen Beschichtungszuständen wurden nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium nahezu keine Bakterien detektiert. Im Gegensatz dazu wurde für Bruschit mit und ohne Strontiumzusatz eine deutlich stärkere Besiedlung mit adhärenenten Bakterien verzeichnet. Erfolgte die Inkubation in einer Bakteriensuspension von  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 1 ml, so wurden dieselben Tendenzen detektiert.



**Brusshit****Cu1****Brusshit / 20 mM Sr****Cu 2**

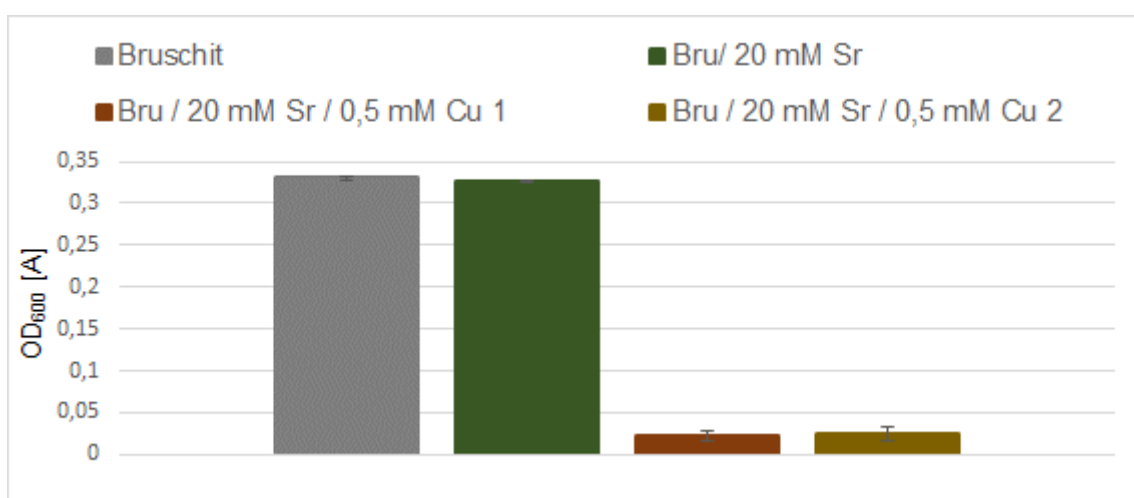
**Abbildung 18      Fluoreszenzmikroskopie der mit GFP-gelabelten  
*E.coli* SM 2029 belegten Beschichtungsoberfläche**

Die Abbildung 19 stellt den mit Image J ermittelten prozentualen Bedeckungsgrad für je 15 Aufnahmen pro Probe dar. Bei dem Beschichtungszustand Brusshit lag die prozentual von Bakterien belegte Fläche nach der 17-stündigen Inkubation bei ca. 7 %. Mit Strontiumzusatz von 20 mM zur CPP-Abscheidung wurde dagegen nahezu die Hälfte der Beschichtungsfläche mit *E.coli* SM 2029 belegt. Während bei den strontiumhaltigen Beschichtungen 7-16 % der Oberfläche mit Bakterien belegt waren, wurden auf den Oberflächen der strontium- und kupferhaltigen Beschichtungszuständen (Cu 1 und Cu 2) weniger als 0,14 % der Fläche mit Bakterien bedeckt. Der Einfluss der abgeschiedenen Masse an Kupfer in den Beschichtungen wurde ebenfalls nach Aussaat einer Bakteriensuspension mit einer 10-fach geringeren Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml belegt. Diese Ergebnisse sind im Anhang (s. Anhang 6) hinterlegt.



**Abbildung 19** Prozentual bedeckte Fläche der Beschichtungsoberflächen mit *E.coli* SM 2029 nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium, Mittelwert von je 2 Proben pro Zustand und 15 Aufnahmen pro Probe

Abbildung 20 stellt die Ergebnisse der Extinktionsmessung ( $OD_{600}$ ) der jeweiligen abgenommenen Bakteriensuspensionen nach Beendigung der Inkubation dar. Während bei Bruschit mit bzw. ohne Strontiumzusatz optische Dichten ( $OD_{600}$ ) von 0,3 A bestimmt wurden, lagen die  $OD_{600}$  der Inkubationslösung der kupferhaltigen Beschichtungen bei nur 0,03 A. In diesem ersten Versuchsssetup wurden keine Serumproteine im Biofilmmedium verwendet, da in Voruntersuchungen eine Zugabe von Serum zu den Referenzlösungen zu einer Trübung und anschließender Ausfällung von schwerlöslichen Komponenten führte.



**Abbildung 20** Bestimmung der optischen Dichten bei 600 nm der abgenommenen Bakteriensuspension nach 17-stündiger Inkubation der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände

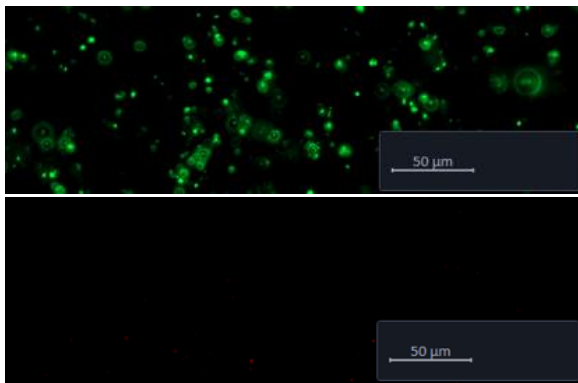
### 5.3.2 Beurteilung der Bakterienviabilität

Die Abbildung 21 zeigt die Anfärbung der adhärenenten Bakterien mittels Live/Dead-Kit nach 17-stündiger Inkubation dieser Beschichtungszustände mit der Bakteriensuspension im Biofilmmmedium. Bei allen Beschichtungszuständen war der prozentuale Anteil der adhärenenten toten Bakterien (rote Fluoreszenz) im Vergleich zu den adhärenenten lebenden Bakterien sehr gering. Während bei den nur Strontium enthaltenden Beschichtungen eine hohe Anzahl an lebenden Bakterien detektiert wurde, konnte bei den zusätzlich Kupfer enthaltenden Beschichtungen sowohl keine lebenden als auch keine toten Bakterien nachgewiesen werden.

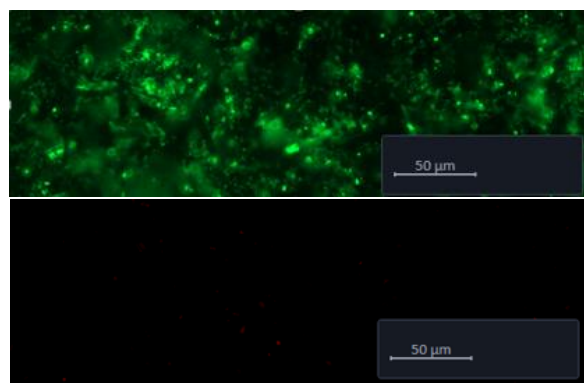
**Syto®9 / Propidiumiodid**

**Syto®9 / Propidiumiodid**

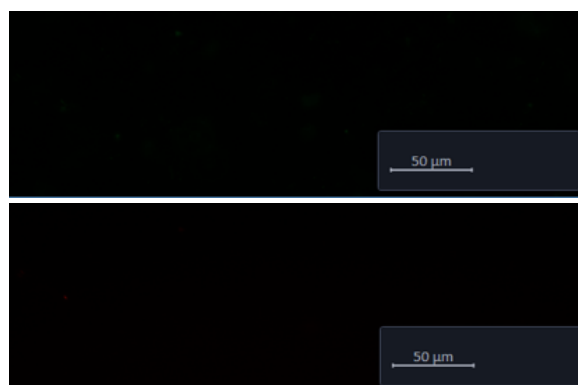
**Bruschi**



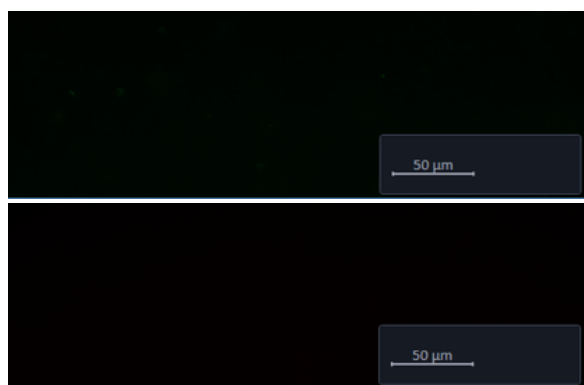
**Bruschi / 20 mM Sr**



**Cu 1**



**Cu 2**



**Abbildung 21** Live/Dead-Färbung der adhärenenten Bakterien an den spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen nach 17-stündiger Inkubation dieser Proben im Biofilmmmedium

## **6 Diskussion der Ergebnisse**

Nachfolgend werden die in Kapitel 5 beschriebenen Ergebnisse in Hinblick auf drei folgende thematische Bereiche diskutiert. Der erste Abschnitt beschäftigt sich damit, inwiefern die Art und Weise der Kupferintegration - elektrochemische Abscheidung mit Reduktions- und Adsorptionsprozessen sowie der reine Adsorptionsprozess - die Zusammensetzung der abgeschiedenen Beschichtungszustände hinsichtlich der Kalziumphosphatmatrix (Kalzium, Phosphat) und der integrierten Spurenelemente Kupfer und Strontium sowie der abgeschiedenen CPP auf den Titanoberflächen beeinflusst. Im nächsten Abschnitt wird diskutiert, inwieweit die jeweilige Immobilisierungsmethode des Kupfers das Freisetzungsverhalten der spurenelementhaltigen CPP im serumhaltigen Inkubationsmedium beeinflusst. Der dritte Abschnitt analysiert die Bakterienadhäsion an den spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium.

### **6.1 Zusammensetzung und CPP nach elektrochemischer Abscheidung**

#### **6.1.1 Vergleich der Belegungsdichten an Kupfer- und Strontiumionen in Abhängigkeit der Immobilisierungsmethode des Kupfers**

Die in Kapitel 5.1 dargestellten Belegungsdichten an Kupfer der strontiumfreien und strontiumhaltigen Beschichtungszustände zeigen, dass eine Integration des Kupfers in die Kalziumphosphatmatrix mit den drei gewählten Beschichtungsstrategien (Kapitel 4.2) möglich war. Mit nachträglicher Adsorption von Kupfer aus einer 0,5 mM Kupfernitratlösung an eine bereits abgeschiedene CPP wurden trotz längerer Adsorptionszeit im Vergleich zum elektrochemischen Abscheidungsprozess mit gleicher Kupferkonzentration die geringsten Belegungsdichten an Kupfer von ca. 25-50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  detektiert. In Voruntersuchen mit dieser 0,5 mM Kupfernitratlösung wurde der Einfluss der Adsorptionszeit auf die abgeschiedene Masse an Kupfer deutlich: wurde die Adsorptionszeit von 1 h auf 24 h erhöht, so stiegen die abgeschiedenen Massen an Kupfer um 50 %. Die Forschungsgruppe von Hamidi et al. (2016) untersuchte das Sorptionsverhalten von zweiwertigen Kupferionen an Brushit unter statischen Versuchsbedingungen. Hamidi et al. schlussfolgerten aus ihren Forschungsergebnissen, dass die Adsorption als Chemisorption in zwei Schritten abläuft. Der erste Prozess besteht aus einem schnell ablaufenden Diffusionsprozess an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Feststoff. Im zweiten Schritt wird 300-400 min nach Reaktionsbeginn ein Gleichgewicht der Ionenaustauschprozesse

zwischen dem Kalzium in der CPP und dem Kupfer in Lösung erreicht. Entsprechend können mit der angewendeten Kupferkonzentration von 5 mM bei 24-stündiger Adsorptionszeit keine höheren Belegungsdichten erzielt werden können. Bei Einsatz identischer Kupferkonzentration wurden mittels elektrochemischer Abscheidung bei dem Referenzzustand Kupferzugabe im Elektrolyten mit Strontiumzusatz im Vergleich zur Methode mit nachträglicher Adsorption des Kupfers deutlich höhere Belegungsdichten an Kupfer erzielt. Innerhalb einer Abscheidungszeit von 1800 s, die im Vergleich zur Kupferbadbehandlung einem Bruchteil der Adsorptionszeit entspricht, wurde die zwei- bis vierfache Masse an Kupfer im Zuge der simultanen Abscheidung mittels ECAD erreicht. Bei der elektrochemischen Abscheidung einer Kupferbasisschicht aus einer angesäuerten 0,24 M Kupfersulfatlösung wurden mittels Elektrolyse, die allerdings sowohl mit einer 6-fach höhere Stromdichte ( $9 \text{ mA/cm}^2$ ) als auch mit einer nahezu drei Größenordnung höheren Kupferkonzentration ca. 20-fach höhere Belegungsdichten an Kupfer abgeschieden. Jedoch sollten mit der Abscheidung einer Kupferbasisschicht möglichst metallische Kupferspezien abgeschieden werden.

Wurde die Kupferbadbehandlung an strontiumhaltigen Beschichtungen durchgeführt, so wurden ca. 50 % geringe abgeschiedene Masse an Kupfer in diesen Beschichtungen detektiert. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die abgeschiedenen Belegungsdichten an Kalziumphosphat in den strontiumhaltigen Beschichtungen im Vergleich zu den Beschichtungen ohne Strontiumzusatz ca. 20 % niedriger lagen und demzufolge dies die abgeschiedenen Kupfermassen nahezu aufheben kann. Bei den Beschichtungszuständen mit einer Kupferbasisschicht sollte der Strontiumzusatz im Elektrolyten keinen Einfluss auf die Belegungsdichte an Kupfer aufweisen, weil eine Art Zweischichtaufbau in dieser CPP vorliegt. Allerdings könnte das hochkonzentrierte Kupfer im sauren pH - Bereich über elektrolytische Prozesse direkt an der Oberfläche zu metallischem bzw. einwertigem Kupfer reduziert und anschließend zügig oberflächlich oxidiert werden. Weil im Abscheidungsprozess der CPP in Oberflächennähe der pH - Wert stark alkalisch ist, könnten sich Kupferhydroxidkomplexe ( $\text{Cu}(\text{OH})_4$ ) ausbilden (Cudennec und Lecerf (2013)). Weiterhin kann die elektrochemische CPP - Abscheidung durch den Strontiumzusatz im Elektrolyten gestört werden. Infolgedessen kann sich die Konzentration an Hydroxidionen in Oberflächennähe erhöhen und die zunehmende Bildung von Kupferhydroxidkomplexen beschleunigt die Auflösung der

Kupferbasisschicht. Eine weitere Erklärung für den Strontiumeinfluss auf eine Kupferbasisschicht kann sein, dass die gelösten Kupferhydroxidkomplexe aufgrund der hohen Affinität zum Brushit an das nachfolgend abgeschiedene Brushit stärker adsorbieren als an Brushit mit Strontiumzusatz.

Mittels XPS-Messungen (Kapitel 5.1.4) wurde bei einer typischen Eindringtiefe der Röntgenstrahlung von ca. 5-10 nm einwertiges Kupfer in den Beschichtungszuständen Kupferbadbehandlung mit NaOH-Nachbehandlung sowie Kupferbasisschicht mit und ohne NaOH-Behandlung detektiert (Abb.10, A). In den Beschichtungszuständen mit Kupferbadbehandlung (ohne nachfolgende NaOH-Behandlung), Kupferzugabe im Elektrolyten sowie einer mit Ascorbinsäure abgeschiedenen Kupferbasisschicht wurden zusätzlich 20-30 % des Kupfers als zweiwertiges Kupfers bestimmt (Abb.10, B). Die Tendenz, dass mit elektrochemischer Abscheidung deutlich höhere abgeschiedene Massen an Kupfer als mit reinen Adsorptionsprozessen erzielt werden können, wurde mit den ermittelten Atom% in den Beschichtungszuständen bestärkt. Jedoch wurden für die Beschichtungszustände mit einer Kupferbasisschicht geringe Atom% an Kupfer ermittelt, obwohl diese Beschichtungsstrategie die höchsten abgeschiedenen Massen an Kupfer enthielten. Weil die Eindringtiefe nicht groß genug ist, kann der Oxidationszustand des Kupfers direkt an der Grenzfläche zum Titanoxid für diese Schichten nicht ermittelt werden. Vermutlich wurde bei den Kupferbasisschichten das an den Kristallen befindliche Kupfer detektiert. Dies ist auch daraus ersichtlich, dass kein Titansignal detektiert wurde. Mit nachträglicher Adsorption des Kupfers an eine CPP ist aufgrund des fehlenden Reduktionsmittels zu erwarten, dass zweiwertiges Kupfer detektiert wird. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Kupfer durch Röntgenstrahlung reduziert werden kann (Cano et al. (2001); Chusuei et al. (1999)). Dieser Reduktionsvorgang infolge der Röntgenstrahlung könnte das einwertige Kupfer in dieser Beschichtung erklären. Die Reduktion des Kupfers direkt an der Oberfläche der Brushitkristalle kann mit Wasserstoff als Reduktionsmittel, welches während der Abscheidung gebildet wird, erklärt werden. Weil Elektronen durch eine nichtleitende Kalziumphosphatschicht nicht transportiert werden können, ist der im Verlauf der Abscheidung gebildete Wasserstoff das einzig mögliche Reduktionsmittel (Wolf-Brandstetter et al. (2013)).

Tabelle 11 fasst die Literaturwerte für Kupferverbindungen zusammen, die zu den ermittelten Bindungsenergien der Cu 2p Region in den Beschichtungsoberflächen nahezu identisch sind.

**Tabelle 11 Literaturwerte für Peakpositionen von Cu 2p<sub>3/2</sub>**

Kupfer (Cu 2p <sub>3/2</sub> )	Chemische Verbindung	Bindungsenergie [eV]	Literaturquelle
	Cu(O)	932,67 932,6 ± 0,025	NIST-Datenbank, Version, 3.5 Biesinger et al. (2010)
	Cu <sub>2</sub> O	932,5 932,1 ± 0,1 932,6	Bastidas et al. (2001) Biesinger et al. (2010) Hernandez et al. (2001)
	CuO	933,7 933,7 ± 0,1	NIST-Datenbank, Version 3.5 Biesinger et al. (2010)
	Cu(OH) <sub>2</sub>	934,5 934,6 ± 0,02 934,9	Bastidas et al. (2001) Biesinger et al. (2010) Hernandez et al. (2001)
	CuCO <sub>3</sub>	935,0	NIST-Datenbank Version 3.5

Der C 1s-Peak bei den spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen mit Bindungsenergien von 284,9 eV bzw. 287,7 eV lässt auf eine Kontamination mit Kohlenstoff in Form aliphatischer Kohlenwasserstoffe schließen (Abb. 11) (Pan et al. (2007)). Eine dritte Komponente im C 1s-Peak mit einer Bindungsenergie von 289,3 eV kann dem Karbonat zugeordnet werden (Ni und Ratner (2008)). Gemäß einer Onlinerecherche in der XPS-Datenbank des National Institute of Standard and Technology (NIST, Version 3,5) sind für das Karbonat in den NaOH behandelten Beschichtungszuständen folgende chemische Verbindungen denkbar: Kalziumkarbonat bei 290,1 eV sowie 289,6 ± 0,2 eV, Natriumkarbonat bei 289,45 eV ± 0,05 sowie Natriumhydrogenkarbonat bei 290 eV, Strontiumkarbonat bei 289,3 ± 0,3 eV. Die Literaturwerte für die Peakpositionen von Sr 3p<sub>3/2</sub> sind in Tabelle 12 dargestellt. Die häufig auftretende, einzelne Komponente (grüne Messkurve, Abb. 11) der Sr 3p-Peaks konnte dabei keiner der bekannten chemischen Verbindungen des Kohlenstoffs oder des Strontiums zugeordnet werden.

**Tabelle 12 Literaturwerte für Peakpositionen von Sr 2p<sub>3/2</sub>**

Strontium(Sr 2p <sub>3/2</sub> )	Chemische Verbindung	Bindungsenergie [eV]	Literaturquelle
	SrO	269,1 ± 0,1 269,2	NIST-Datenbank, Version 3,5 Young und Otagawa, 1984
	SrCO <sub>3</sub>	269,0±0,1	NIST-Datenbank, Version 3,5
	SrNO <sub>3</sub>	269,5	Young und Otagawa, 1984
	Sr	269,8	NIST-Datenbank, Version 3,5

Mit nachträglicher NaOH-Behandlung der Beschichtungszustände wurden Natrium mit Atomprozenten von 6,5-13,4 sowie Fluor mit 0,08-2,63 Atom% detektiert. Dies lässt auf eine Verunreinigung des Natriumhydroxids mit Fluor schließen.

### **6.1.2 Vergleich der Belegungsdichten an Kalzium und Phosphat sowie CPP in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode der Kupferionen**

Aus den Ergebnissen in Abschnitt 5.1 ist ersichtlich, dass mit Strontiumzusatz im Elektrolyten zur Bruchitabscheidung sowie den drei Immobilisierungsmethoden von Kupfer in die CPP zusätzlich zu den Hauptkomponenten der Kalziumphosphatmatrix (Kalzium, Phosphat) die Spurenelemente Strontium und Kupfer in die Beschichtungen integriert werden. Unabhängig von der Immobilisierungsstrategie des Kupfers verringerte sich jedoch bei den strontiumhaltigen Beschichtungen im Vergleich zu den strontiumfreien Beschichtungen die abgeschiedene Masse an Kalzium in den Beschichtungen um ca. 30-43 %. Möglich ist, dass die Kalziumbindungsplätze im Kristallgitter des Bruchits durch die ebenfalls zweiwertigen Strontiumionen belegt werden. Rokita et al. (1993) untersuchten an Kristallstrukturen von Kalziumphosphaten, inwiefern sich die Belegung der Kalziumbindungsplätze im Kristallgitter des Bruchits durch Strontiumionen auswirkt. Mittels EXAFS-Spektroskopie (engl. extended X-ray absorption fine structure), welches ein Verfahren der Röntgenadsorptionsspektroskopie zur Analyse der kantennahen Feinstruktur eines Röntgenspektrums darstellt, sowie Kristallstrukturanalyse am strontiumsubstituierten Bruchit schlussfolgerten Rokita et al., dass alle vier Kalziumbindungsplätze im Kristallgitter des Bruchits durch Strontiumatome belegt werden können. Weiterhin ist anhand der molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der kupferhaltigen Beschichtungen mit und ohne Strontiumzusatz (Tabelle 6) davon auszugehen, dass veränderte CPP auf den Titanoberflächen abgeschieden wurden: das molare Kalzium zu Phosphat - Verhältnis von 1,1 der Beschichtungen ohne



Strontiumzusatz entspricht nahezu dem molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnis der Bruschitreferenz und kann gemäß Boanini et al. (2009) nahezu dem theoretischen Kalzium zu Phosphat-Verhältnis von Bruschit von 1,0 zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu weist Boanini et al. (2009) den kupferhaltigen CPP mit Strontiumzusatz, der zu einem Strontiumanteil von ca. 1 % an den Beschichtungen führte, mit molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnissen von 0,5-0,7 keine bekannte CPP zu. Zwar ordnet Boanini et al. (2009) den CPP Kalziumdihydrogenphosphatmonohydrat und wasserfreies Kalziumdihydrogenphosphat jeweils ein molares Kalzium zu Phosphat-Verhältnis von 0,5 zu, jedoch können beide CPP aufgrund der spezifischen Randbedingungen während der Herstellungsprozesse ausgeschlossen werden. Kalziumdihydrogenphosphatmonohydrat bildet sich bei der Titration von Phosphorsäure mit Kalziumhydroxid in einem sehr sauren Milieu aus, wasserfreies Kalziumdihydrogenphosphat entsteht durch Wärmebehandlung an Kalziumdihydrogenphosphatmonohydrat bei über 700°C. Die vergleichsweise niedrigen Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der kupferhaltigen Beschichtungen mit Strontiumzusatz von 0,5 - 0,8 könnten durch die Belegung der Kalziumbildungsplätze mit Strontium im Kristallgitter des Bruschits oder der Bildung von Strontium- bzw. Kupferphosphatverbindungen erklärt werden. Allerdings unterschieden sich bei den kupferhaltigen Beschichtungszuständen mit Strontiumzusatz mit Ausnahme des Referenzzustandes die Kalzium zu Phosphat-, sowie Kalzium und Strontium zu Phosphat - Verhältnisse nur marginal in der zweiten Nachkommastelle (< 2%), sodass von einer minimalen Besetzung der Kalziumbindungsplätze mit Strontium im Kristallgitter der CPP auszugehen ist. Bei dem Referenzzustand mit Kupferzugabe im Elektrolyten ist der relative Einfluss der integrierten Spurenelemente mit 9 % höher. Dies ist vermutlich auf den größeren Ionenradius des Strontiums zurückzuführen, der einen Einbau des Strontiums entsprechend des molaren Verhältnisses von Kalzium zu Strontium im Elektrolyten von ca. 1:2 für 20 mM Sr nicht ermöglicht (Boanini et al. (2009); Schumacher und Gelinsky (2015)). In den REM-Aufnahmen der kupferhaltigen Beschichtungen mit Strontiumzusatz (Kapitel 5.2.4) zeigte sich, dass die Oberflächen geprägt waren von Bruschitplatten sowie in unterschiedlichen Größen auftretenden globulären Agglomeraten. Diese unterschiedlichen Oberflächenmorphologien der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände könnten auf die Belegung der Kalziumbindungsplätze durch Strontium oder Kupfer im Kristallgitter zurückzuführen werden, die letztlich dazu führen, dass die

regelmäßige Anordnung der Bausteine (Ionen) in der Kristallstruktur nicht gestört wird. Madsen und Rosa (2010) beschreiben, dass bei Präzipitationen aus gesättigten Lösungen ab einer Ionenkonzentration an Kupfer oder an Strontium von 1 mM Störungen im Kristallwachstum durch Adsorption der Spurenelemente Strontium und Kupfer an die Kristalloberfläche auftreten können. Beim Referenzzustand Kupferzugabe im Elektrolyten mit Strontiumzusatz waren Dendrite als separate Phasen zu erkennen (Tab. 8), die Kupferverbindungen zugeordnet werden können. Die Identifikation des Kupfers in derartigen Dendriten erfolgte zuvor an Proben mit geringfügig modifizierten Abscheidungsbedingungen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX). Weiterhin können sich im elektrochemischen Abscheidungsprozess dieses Beschichtungszustandes basische Kupferphosphatverbindungen wie beispielsweise Pseudomalachit ( $\text{Cu}_5(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_4$ ) und Cornetit ( $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)(\text{OH})_3$ ) oder Strontiumhydrogenphosphat ( $\text{SrHPO}_4$ ) ausbilden, die ebenfalls die Ausbildung heterogener Morphologien auf dieser Beschichtungsfläche erklären (Frost et al. (2002); Ropp (2012)). Die Bildung von Strontiumhydrogenphosphat kann auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Morphologien an den Beschichtungen mit Strontiumzusatz mit nachträglicher Kupferbadbehandlung oder der auf einer Kupferbasisschicht abgeschiedenen CPP sein. Durch Umwandlung des Bruschits in thermodynamisch stabilere Phasen mit höherem Kalzium zu Phosphatverhältnis stehen die verbleibenden Phosphationen für die Ausfällung weiterer schwer löslicher Phasen zur Verfügung.

Die Auswertung der FTIR - Messungen (Kapitel 5.1.3) der kupferhaltigen Beschichtungszustände mit und ohne Strontium erfolgte hinsichtlich der Banden der Phosphate, weil mit diesen Banden eine Zuordnung der abgeschiedenen CPP möglich ist. Im Spektrum des Referenzzustandes Bruschit (Abb. 8) wurden als charakteristische Banden die  $\nu_2$  Phosphatschwingung als Doppelschwingung bei  $987\text{ cm}^{-1}$  und  $1000\text{ cm}^{-1}$  sowie die  $\nu_6$  Phosphatschwingung zwischen  $1058\text{ cm}^{-1}$  und  $1137\text{ cm}^{-1}$  detektiert, die durch die Einlagerung des  $\text{HPO}_4^{2-}$  Ions im Kristallgitter des Bruschits erklärt werden können (Pleshko et al.(1991)). Weitere markante Banden der Phosphatgruppen des Bruschits wurden bei  $880\text{ cm}^{-1}$ ,  $1110\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  und  $1010\text{ cm}^{-1}$  detektiert (Xie et al. (2009)).

Das bei allen drei Referenzzuständen erkennbare Rauschen zwischen den Wellenzahlen von  $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  ist auf die in der Atmosphäre vorliegenden Wassermoleküle zurückzuführen, die nicht exakt von dem Messhintergrund

subtrahiert werden konnten. In den Spektren der Beschichtungszustände ohne anschließende NaOH-Behandlung (Abb. 9) konnten charakteristische Banden bei  $890\text{ cm}^{-1}$ ,  $1010\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1110\text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden. Diese detektierten Banden waren zu den Phosphatbanden im Referenzzustand Brushit ähnlich. Aus den FTIR - Spektren der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände ohne Strontiumzusatz kann amorphes Kalziumphosphat (ACP) in diesen Beschichtungsoberflächen ausgeschlossen werden, weil die für ACP-charakteristische verbreiterte Bande bei  $1050\text{ cm}^{-1}$  in den Spektren dieser CPP fehlt (Roessler et al. (2003)). Bei den REM-Aufnahmen der kupferhaltigen Beschichtungen ohne Strontiumzusatz (Kapitel 5.2.4) war zu erkennen, dass die Oberflächen der auf einer Kupferbasisschicht aufgelagerten CPP sowie der CPP mit nachträglicher Kupferbadbehandlung geprägt waren von der charakteristischen Plattenmorphologie des Brushits (Tab. 9,10). Aus den molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnissen, den FTIR - Spektren sowie den REM-Aufnahmen der kupferhaltigen Beschichtungen ohne Strontiumzusatz kann auf eine sehr geringe Einflussnahme der coabgeschiedenen Kupferspezies auf die Ausprägung der spezifischen CPP in diesen Beschichtungen geschlossen werden. Bei den Kupferbasisschichten kann prinzipiell auch eine andere Art der Keimbildung auf dem Kupfer im Vergleich zu der sonst vorhandenen Titanoxidoberfläche beispielsweise durch die fehlenden Wechselwirkungen von Kalzium mit Sauerstoff bzw. Hydroxylgruppen an dem Titanoxid stattfinden. Allerdings ist davon auszugehen, dass das Kupfer während der Brushitabscheidung nicht in diese CPP einlagert wird. Demzufolge sollte das Kupfer nur die aufgelagerte CPP beeinflussen, wenn eine Remobilisierung dieser Kupferbasisschicht stattfindet.

In Voruntersuchungen mittels Röntgendiffraktometrie (X-ray diffraction - XRD) (s. Anhang 6) an kupferhaltigen Beschichtungszuständen mit und ohne Strontiumzusatz sowie Brushit als Referenzzustand konnte die Ausbildung von Brushit als einzige kristalline CPP in diesen Beschichtungszuständen nachgewiesen werden. Allerdings können aus den Röntgendiffraktogrammen die Anwesenheit zusätzlicher amorpher Phasen beispielsweise bestehend aus Strontium- und Kupferhydrogenphosphatverbindungen nicht ausgeschlossen werden. Mit den Analysemethoden XRD und FTIR-Messung wurden keine weiteren kristallinen Phasen als Brushit in den spurenelementhaltigen Beschichtungszuständen aufgenommen, trotz nachweislich abgeschiedener Massen an Strontium und Kupfer an den

Beschichtungen. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Anteil an integrierten Spurenelementen im Kristallgitter so minimal war, dass trotz einer Belegung der Kalziumplätze im Kristallgitter die Kristallstruktur der CPP weitestgehend erhalten blieb. Rosa und Madsen (2010) untersuchten nasschemisch ausgefällten Brushit mit integriertem Kupfer und Strontium mittels XRD und FTIR und konnten ebenfalls aus ihren Spektren keine weitere CPP als Brushit nachweisen. Rosa und Madsen (2010) untersuchten den Einfluss des Kupfers auf die Kinetik des Kristallwachstums von Brushit und schlussfolgerten aus ihren FTIR-Messungen, dass trotz der Zugabe von 0,06 mM bis 0,5 mM Kupferlösung zum Elektrolyten kein Einfluss auf die aufgenommenen Spektren zuerkennen war und nur Brushit als CPP detektiert wurde.

Die durch Zugabe von Kupfer im Elektrolyten sowie der nachträglichen Adsorption einer Kupferlösung an eine bereits abgeschiedene CPP verringerten Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse im Vergleich zu Brushit könnten ebenfalls auf eine Substitution des Kalziums durch das zweiwertige Kupfer im Kristallgitter der CPP hindeuten. Madsen (1975) beschreibt, dass erstens zweiwertige Kupferionen eine hohe Affinität zu Brushit aufweisen sowie zweitens eine konzentrationsabhängige Adsorption von Kupferionen in die Adsorptionsschicht oder in die Oberflächenschicht des Brushitkristalls möglich ist. Nach erfolgter Adsorption der Kupferionen an die Kristalloberfläche können diese ab einer Kupferkonzentration von über 4  $\mu\text{mol/l}$  über Ionenaustauschprozesse von Kalzium gegen Kupfer ins Kristallinnere transportiert werden. Aufgrund des sehr geringen Anteils an Kupfer von ca. 1 % in den Beschichtungen sowie der marginalen Unterschiede zwischen den molaren Kalzium zu Phosphat- sowie den Kalzium und Kupfer zu Phosphat-Verhältnissen ist allerdings davon auszugehen, dass diese Austauschprozesse in sehr geringem Ausmaß stattfinden. Im Vergleich zur Brushitreferenz wurden bei den spurenelementhaltigen Beschichtungen deutlich geringe abgeschiedene Massen der Kalziumphosphatmatrix auf den Titanoberflächen detektiert. Dies zeigt, dass bei Zusatz von Strontium und / oder Kupfer zur elektrochemischen Abscheidung dieser Prozess erheblich gestört wird.

### 6.1.3 Auswirkungen der anschließenden NaOH-Behandlung der Beschichtungen auf die Belegungsdichten und CPP

Die im Unterkapitel 5.1.4 dargestellten molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der jeweils mit 0,1 M NaOH nachbehandelten strontiumfreien Beschichtungen nach Kupferbadbehandlung sowie auf einer Kupferbasisschicht weisen im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Beschichtungen ein deutliches höheres molares Kalzium zu Phosphat-Verhältnis von  $1,55 \pm 0,01$  (Kupferbadbehandlung),  $1,24 \pm 0,2$  (Kupferbasisschicht) sowie  $1,58 \pm 0,09$  (Kupferbasisschicht mit Ascorbinsäure) auf. Gemäß Boanini et al. (2009) können diese molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der Beschichtungszustände ohne Strontiumzusatz auf der abgeschiedenen Kupferbasisschicht mit Ausnahme der Bruschitabscheidung den CPP mit den theoretischen molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnissen des kalziumdefizitären Hydroxylapatits mit 1,5 sowie Hydroxylapatit mit 1,67 entsprechen. Weiterhin ordnet Boanini et al. (2009) die CPP  $\alpha$ -Trikalziumphosphat sowie  $\beta$ -Trikalziumphosphat dem theoretischen Kalzium zu Phosphat-Verhältnis von 1,5 zu. Die letzten beiden genannten CPP können ausgeschlossen werden, weil zur Umwandlung von  $\alpha$ -Trikalziumphosphat in  $\beta$ -Trikalziumphosphat eine Hitzebehandlung von 1300 °C notwendig ist. Eine zweite Möglichkeit zur Bildung von  $\beta$ -Trikalziumphosphat ist die Reaktion von Kalziumkarbonat und Bruschit über 900 °C.

Erfolgte eine NaOH-Behandlung der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände, so konnten in den FTIR-Spektren (Kapitel 5.1.3) weder die charakteristischen Phosphatbanden des Bruschits noch des Hydroxylapatits nachgewiesen werden. Stattdessen ähnelten die Banden der NaOH-behandelten CPP bei Wellenzahlen von  $1060\text{ cm}^{-1}$ ,  $1000\text{ cm}^{-1}$  und  $995\text{ cm}^{-1}$  den Banden des Monetits, der wasserfreien Form des Bruschits. Allerdings kann Monetit als CPP ausgeschlossen werden, da diese CPP bei der Umwandlung von Bruschit durch eine Wärmebehandlung bei mindestens 100 °C erfolgt und bei der Durchführung des NaOH-Bads der Beschichtungszustände nur 60 °C angewendet wurden (Boanini et al. (2009)). Weiterhin ist fraglich, ob das Kristallwasser des Bruschits in einer wässrigen Lösung abgegeben werden kann. Die Banden bei ca.  $880\text{ cm}^{-1}$ ,  $1420\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1590\text{ cm}^{-1}$  können den Banden der Karbonationen ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) zugeordnet werden (Roessler et al. (2003)). Karbonationen entstehen bei der Probenlagerung im NaOH-Bad durch die Reaktion von Hydroxylionen ( $\text{OH}^-$ ) mit Kohlenstoffdioxid aus der Luft:  $\text{CO}_2 + 2\text{OH}^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ . Fleet et al. (2014) ordnet den zusätzlichen Banden in dem

Spektrum der NaOH-behandelten Beschichtungszustände bei Wellenzahlen von  $1540\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1460\text{ cm}^{-1}$  das karbonisierte HAP zu.

Stulajterova und Medvecký (2007) untersuchten die Umwandlung von Brushit zu dem thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit in einem NaOH-Bad mit einem initialen pH - Wert der Natriumhydroxidlösung von 10,8 bei einer Temperatur von  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stulajterova et al. schlussfolgerten aus XRD- und FTIR Messungen, dass nach erst nach 24-stündiger Auslagerung einer Brushitprobe in 120 ml Natriumhydroxid durch Auflösungs- und Präzipitationsprozesse das Brushit in stöchiometrisches HAP umgewandelt wird. Somit können die ermittelten molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse der kupferhaltigen Beschichtungen ohne Strontiumzusatz von ca. 1,5 sowie die dem karbonisierten HAP zugeordneten FTIR-Banden auf das Vorliegen einer CPP mit HAP-ähnlicher Kristallstruktur hindeuten.

Bei zusätzlicher Integration von Strontium erhöhten sich infolge der NaOH-Behandlung die molaren Kalzium zu Phosphat - Verhältnisse von 1,13 auf 1,38 (Kupferbadbehandlung) sowie von 0,91 auf 0,93 (Kupferbasisschichten). Bei den REM-Aufnahmen der kupferhaltigen Beschichtungen mit und ohne Strontiumzusatz, welche mit NaOH-nachbehandelt wurden, waren die von feinen Strukturen geprägten Oberflächen zu erkennen, die sich deutlich in der Morphologie der unbehandelten Beschichtungszustände unterschieden (Kapitel 4.2.4). Aus den molaren Kalzium zu Phosphat - Verhältnissen, den FTIR - Messungen sowie den REM - Aufnahmen der kupferhaltigen Beschichtungen mit und ohne Strontiumzusatz mit anschließender NaOH-Behandlung kann auf eine Phasenumwandlung der spurenelementhaltigen CPP in CPP geschlossen werden, welche gemäß Boanini et al. (2009) keiner der bereits diskutierten CPP entspricht.

## **6.2 Verhalten der abgeschiedenen CPP in dem serumhaltigen Medium TAS-SBF während der Inkubation im serumhaltigen Inkubationsmedium**

Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass bei Kupferzugabe im Elektrolyten eine nahezu vollständige Freisetzung der immobilisierten Kupferionen im ersten Inkubationsintervall erfolgt, während in den folgenden drei Tagen das Kupfer nur noch minimal im Bereich von  $0,5\text{--}0,7\text{ }\mu\text{g/ml}$  freigesetzt wird (s. Anhang 1). Sowohl mit adsorptiv gebundenem Kupfer an eine bereits abgeschiedene CPP als auch mit auf einer Kupferbasisschicht aufgelagerten CPP wurden weder eine konstante Freisetzung annähernd nullter Ordnung noch eine 2-Schritt-Freisetzung, d.h. ein

initialer Peak gefolgt von einer gleichmäßigen Freisetzung auf niedrigerem Niveau, realisiert (s. Anhang 3). Mit nachträglicher Adsorption von Kupfer an eine CPP wurden nach 24-stündiger Inkubation zwar ca. 50 % der initial immobilisierten Kupfermenge in das Medium freigesetzt, aber ab dem zweiten Inkubationstag erfolgte trotz einer Restbelegungsdichte an Kupfer von 8-26  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  kaum noch eine Freisetzung der Kupferionen in das Medium. Möglich ist, dass Serumproteine aus dem Inkubationsmedium die Beschichtungsoberfläche bedecken und demzufolge die Freisetzung des Kupfers erschweren. Weiterhin können diese Proteine Kupfer komplexieren, sodass das für die Diffusion notwendige Konzentrationsgefälle dieser Ionen aufgehoben wird (Juhasz et al. (2007)).

Auch bei den Beschichtungszuständen mit einer Kupferbasisschicht wurden 54-74 % der initial immobilisierten Kupfermenge nach 24-stündiger Inkubation detektiert. Allerdings wurden im weiteren Inkubationsverlauf Kupfer kontinuierlich in hohen Konzentrationen freigesetzt. Trotz der nachfolgend abgeschiedenen CPP auf einer Kupferbasisschicht, die als eine Art Barriere den Zugang der Serumproteine zu dem Kupfer erschweren sollte, wurden hohe Konzentrationen an Kupfer aus diesen Beschichtungszuständen in das Inkubationsmedium freigesetzt. Vermutlich verhindert die Porosität dieser CPP den Zugang der Serumproteine zu dem Kupfer in der Kupferbasisschicht nicht ausreichend. Auch bei den Beschichtungen mit einer Kupferbasisschicht verblieben erhebliche Restbelegungsdichten an Kupfer nach Beendigung der Inkubation.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden wesentlich geringere freigesetzte Konzentrationen an Kupfer nur infolge der NaOH-Behandlung der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände erzielt: 32-35 % (Kupferbadbehandlung) bzw. 6-22 % (Kupferbasisschicht) bezogen auf den jeweiligen Zustand vor Beginn der Inkubation. Schlussfolgernd wurde durch die NaOH-Behandlung dieser CPP das immobilisierte Kupfer in diesen Beschichtungen effektiver in schwerlöslichen Verbindungen wie beispielsweise basischem Kupferkarbonat oder Kupferhydroxid fixiert (MacNevin (2005)). Mit dem Zusatz der L-Ascorbinsäure zur elektrochemischen Abscheidung einer Kupferbasisschicht sollte die Adhäsion des Kupfers an die Titanoberfläche verbessert werden. Jedoch wurden aus dieser Beschichtung trotz NaOH-Behandlung im Vergleich zur ascorbinfreien Abscheidungsvariante Kupfer in höheren Konzentrationen freigesetzt. Möglicherweise wurde die Kupferbasisschicht mit dem Zusatz der Ascorbinsäure in

einer anderen Zusammensetzung abgeschieden, sodass die aufgelagerte Bruschitphase bzw. der Übergangsbereich Kupfer und Bruschit ebenfalls in veränderter Komposition vorliegt.

Im Kapitel 5.2 wurde gezeigt, dass unabhängig von der Beschichtungsstrategie drei unterschiedliche Freisetzungverhalten der CPP im Verlauf der Inkubation in serumhaltiger Tas-SBF hinsichtlich der Kalzium- und Phosphationen zuerkennen waren. Kupferhaltige Beschichtungen ohne Strontiumzusatz entzogen dem Medium Kalzium oder setzten Kalzium in das Inkubationsmedium frei. Mit Strontiumzusatz in den Beschichtungen wurde dem Medium Kalzium kontinuierlich entzogen. Sowohl mit als auch ohne Strontium in den Beschichtungen wurde Phosphat in das Inkubationsmedium freigesetzt. Das dritte Freisetzungverhalten der NaOH-nachbehandelten Beschichtungszustände zeichnet sich dadurch aus, dass diese Beschichtungszustände dem Inkubationsmedium kontinuierlich Kalzium und Phosphat entzogen. Das Inkubationsmedium Tas-SBF ist eine hinsichtlich Kalzium und Phosphat übersättigte Lösung mit einem pH-Wert von 7,4, welches zudem 10 % Serum enthält (Tas und Bhaduri (2004)). Bruschit gilt in wässrigen Lösungen als Vorstufe zur Keimbildung von Apatiten. Hierbei kann sich Bruschit, welches bei einem pH-Wert von 6-7 thermodynamisch instabil ist, durch Lösungs- und Repräzipitationsprozesse in die thermodynamisch stabileren Apatite z. B. Hydroxylapatit umwandeln (Boanini et al. (2009); Tas und Bhaduri (2004)).

Eine höhere Freisetzung von Phosphat im Vergleich zu einer geringeren Freisetzung von Kalzium in das Inkubationsmedium führte bei der Bruschitreferenz zur Erhöhung des molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisses auf 1,5 nach Beendigung der Inkubation (Tabelle 7). Dieses Freisetzungverhalten mit einer stärkeren Freisetzung an Phosphat als an Kalzium in dem serumhaltigen Medium war auch bei der Bruschitabscheidung auf einer Kupferbasisschicht zu beobachten. Die dennoch nahezu unveränderten molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse dieses Beschichtungszustandes nach Abscheidung und nach Beendigung der Inkubation von 1,1 (Tabelle 7) sind nur durch abgeschiedene Kalziumphosphate an den Wells der Wellplatte zu erklären.

Mit nachträglicher Kupferadsorption an Bruschit unterschied sich das Freisetzungverhalten dieser CPP von der Bruschitreferenz, obwohl sich das molare Kalzium zu Phosphat -Verhältnis von 1,1 auf 1,4 nach Beendigung der Inkubation erhöht. Während diese CPP dem Medium Kalzium entzog, wurde im starken Ausmaß



Phosphat in das serumhaltige Medium freigesetzt. Möglicherweise ist dies auf einen Kalziummangel in der Kristallstruktur des Bruschits zurückzuführen, der durch eine Belegung der Kalziumbindungsplätze mit Kupfer entsteht. Weiterhin kann durch Adsorption des Kupfers an die Kristalloberfläche das Kristallwachstum gestört werden.

Infolge der Inkubation im serumhaltigen Medium waren die Oberflächen der kupferhaltigen Beschichtungen ohne Strontiumzusatz geprägt durch unterschiedliche Morphologien (Kapitel 5.2.4), die in Ergänzung zu den sich erhöhenden molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse dieser Beschichtungszustände auf eine Phasenumwandlung des kupferhaltigen Bruschits zu einer momentan nicht näher spezifizierbaren CPP hindeuten.

In den kupferhaltigen Beschichtungen mit Strontiumzusatz kann der durch Belegung der Kalziumbindungsplätze mit Strontium in der Kristallstruktur resultierende Kalziummangel mit der Aufnahme von Kalzium aus dem Medium kompensiert werden. Die kontinuierliche Freisetzung von Phosphat in das serumhaltige Inkubationsmedium ist vermutlich auf einen Phosphatüberschuss in den strontiumhaltigen CPP zurückzuführen. Dieses Freisetzungsverhalten der strontiumhaltigen Beschichtungen mit Kalziumaufnahme aus dem Medium sowie Phosphatfreisetzung in das Medium korrespondiert mit der Erhöhung der molare Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse von 0,5-0,7 auf 0,9-1,2 nach Beendigung der Freisetzung (Tabelle 7).

Mit NaOH-Behandlung der Beschichtungen mit und ohne Strontium entzogen diese Beschichtungen dem serumhaltigen Inkubationsmedium kontinuierliche Kalzium und Phosphat. Die Phasenumwandlung der spurenelementhaltigen CPP in Richtung HAP wurde mit der NaOH-Behandlung bereits eingeleitet, sodass mit der Inkubation dieser Beschichtungszustände im serumhaltigen Medium das Keimwachstum zum HAP mit molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnissen von 1,5 (kalzium-defizitärer HAP) bzw. 1,67 (stöchiometrischer HAP) fortgesetzt werden kann. Aus diesem Grund blieben bei Bruschit mit nachträglicher Kupferbadbehandlung, der Kupferbasisschicht mit strontiumhaltiger CPP sowie die unter Zusatz von Ascorbinsäure abgeschiedene Kupferbasisschicht die molare Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse nach Beendigung der Inkubation nahezu unverändert bei 1,5 (Tabelle 7). Bei den übrigen Beschichtungszuständen erhöhten sich die molaren Kalzium zu Phosphat-Verhältnisse in Richtung 1,5 nach Beendigung der Inkubation (Tabelle 7).

Tas und Bhaduri (2004) schlussfolgerten aus ihren Forschungsergebnissen, dass nach einer 72-stündigen Inkubation von Brushit in Tris- HCl gepufferter Tas-SBF bei 37 °C in erheblichen Mengen kalzium-defizitärer HAP vorliegt. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche in Tas-SBF erfolgte eine vollständige Umwandlung von Brushit in HAP. Die Umwandlung der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände in serumhaltiger Tas-SBF in unbekannte CPP kann durch Belegung der CPP-Oberfläche mit Proteinen aus dem Inkubationsmedium (Juhász et al. (2007)) als auch auf eine Inhibierung der Hydrolyse von Brushit durch Adhäsion der Strontium- und Kupferionen an die Kristalloberfläche (Madsen (2008)) zurückgeführt werden. Madsen (2008) beschreibt, dass die Umwandlung von Brushit zu HAP nach Adhäsion aus 5 µM Strontium- und 10 µM Kupferlösung an die Kristalloberfläche inhibiert wird.

### **6.3 Antimikrobieller Effekt von Kupfer auf *E.coli* SM 2029**

Im Kapitel 5.3 wurde dargestellt, dass die bakterielle Adhäsion an den beschichteten Oberflächen durch *E. coli* SM 2029 abhängig ist von der Zusammensetzung der Beschichtung. Bei den kupferhaltigen Beschichtungszuständen wurden nahezu keine adhärenenten Bakterien nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium detektiert (Abb. 18). Die Darstellung der OD<sub>600</sub> - Messung von den Lösungen nach Beendigung der Inkubation der Beschichtungszustände (Abb. 20) verdeutlicht, dass die Bakterien auch in der umgebenden Suspension abgetötet wurden. Weiterhin kann aus dem sehr geringen Anteil an toten Bakterien an den kupferhaltigen Beschichtungsoberflächen (Abb. 21) geschlossen werden, dass *E.coli* durch freigesetzte Kupferionen aus den Beschichtungen in der Bakteriensuspension getötet wurden. Sollte der toxische Effekt der Kupferionen erst nach Adhäsion der Bakterien auf der Beschichtungsoberfläche eingetreten sein, müsste der Anteil an toten Bakterien höher sein. Das antimikrobielle Potenzial der aus den Beschichtungen freigesetzten Kupferionen für den Modellkeim *E.coli* SM2029 wird anhand der deutlich höheren Bakterienzahl auf CPP mit und ohne Strontium (Abb. 19) ersichtlich. Vermutlich spielt die Zusammensetzung der CPP sowie abgeschiedenes Strontium in den Beschichtungen für die Bakterienadhäsionen eine zusätzliche Rolle. Bisher ist in der Literatur eine positive Wirkung des Strontiums auf die Bakterienadhäsion nicht bekannt. Diesbezüglich sind für detailliertere Aussagen weitere Untersuchungen der Bakterienadhäsion an strontiumhaltigen Beschichtungen erforderlich. Liu et al. (2014)

untersuchten die antibakterielle Eigenschaft von Kupfer-Titan-Legierungen auf den *E.coli* Stamm ATCC 25922, indem diese die Konzentration an Kupferionen in einer Inkubationslösung und die antibakterielle Wirksamkeit in Zusammenhang setzten. Diese Forschergruppe schlussfolgerte, dass ab einer Kupferkonzentration von 0,04 mg/l in einer Inkubationslösung ein antibakterieller Effekt auf den *E.coli* Stamm ATCC 25922 nachgewiesen werden kann. Die nach 17-stündiger Inkubationszeit der spurenelementhaltigen Beschichtungszustände im Biofilmmedium detektierten Kupferkonzentrationen im Bereich von  $18,42 \pm 1,86 \mu\text{g} / \text{ml}$  (Cu 1) sowie  $14,13 \pm 2,8 \mu\text{g} / \text{ml}$  (Cu 2) liegen in den wirksamen Konzentrationen für das hier eingesetzte Bakterium *E.coli* SM 2029 in einer ähnlichen Größenordnung.

#### 6.4 Fehleranfälligkeit der Messmethoden

Die elektrochemische Abscheidung der Kalziumphosphate wurde auf sandgestrahlten und heißgeätzten Titanproben durchgeführt. Jedoch wurde die Variation der tatsächlichen Oberfläche durch den Erwerb der kommerziell hergestellten sandgestrahlten Proben auf minimale Abweichungen reduziert. Durch die manuelle Positionierung der Titanproben in dem Teflonhalter des Probenhalters können die Übergangswiderstände an den zur Kontaktierung verwendeten Goldstiften für jede Probe etwas variieren, was zu einem unterschiedlichen pH-Gradienten an den einzelnen Proben führen kann. Des Weiteren weiteten sich die Teflonummantelungen des Probenhalters im Verlauf der vielfachen Nutzung auf, so dass die Abdichtung der Mantelfläche mit der Zeit weniger effektiv wurde. Zur Bestimmung der Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat- und Kupferionen wurden die Beschichtungen auf den Titanoberflächen mit konzentrierter Salpetersäure in Lösung gebracht, die Lösungen gesammelt und mittels kommerzieller Kits analysiert. Da mikroskopisch keine Reste auf den Titanproben nachweisbar sind, ist davon auszugehen, dass eine vollständige Auflösung der Beschichtung erfolgte. Weiterhin könnte mit dem Kalziumtest auch die zweiwertigen Kationen Strontium und Kupfer erfasst werden und demzufolge die Konzentration des Kalziums in der Messlösung verfälscht werden. Eine Beeinflussung des Kalziumtests durch Kupferionen wurde unter Verwendung relevanter Kupferkonzentrationen ausgeschlossen. Strontiumionen wurden dagegen im Kalziumtest ebenfalls jedoch mit geringerer Intensität erfasst. Auf Basis der spektroskopisch ermittelten Konzentrationen an Strontiumionen in den jeweiligen Beschichtungszuständen wurde eine Korrektur der

Kalziumionenkonzentration vorgenommen. Allerdings ist bei dieser Messkorrektur mit einer Fehleranfälligkeit der Ergebnisse zurechnen. Bei der spektroskopischen Analyse der salpetersauren Messlösungen können spektrale Interferenzen durch die Überdeckung von Atomlinien verschiedener in der Messlösung befindlicher Elemente (z. B. Kalzium, Strontium, Kupfer) oder durch eine gerätetechnische, nicht vollständig bereinigte Untergrundkorrektur auftreten. Weiterhin können nicht-spektrale Interferenzen bei der AAS-Messung auch bei der Messung von proteinhaltigen Inkubationsmedien entstehen, da sich diese Inkubationslösungen hinsichtlich der Viskosität und der Oberflächenspannung von den Kalibrierlösungen unterscheiden. Bei einer XPS-Messung können durch die Röntgenstrahlung Reduktions- und Oxidationsprozesse an der Beschichtungsoberfläche ausgelöst werden, die demzufolge den Oxidationsstatus der Elemente in den Oberflächen verfälschen. Außerdem werden mit einer XPS-Messung nur die oberflächennahen 5-10 nm der Beschichtung repräsentiert. Weitere Messfehler können bei der softwaregestützten Auswertung der XPS-Spektren bei der Entfaltung und der Bestimmung der überlappenden Peaks von Sr 3p<sub>1/2</sub> mit dem Spektrum von C 1s auftreten. Bei homogenen Festkörpermateriale ist mit XPS-Messung eine genaue Quantifizierung der Elemente in diesen Beschichtungen möglich. Trotz dessen dass die spurenelementhaltigen Beschichtungen als inhomogene Materialien angesehen werden können, kann mit der durchgeführten Quantifizierung der Elemente Tendenzen zwischen den Beschichtungsoberflächen abgeschätzt werden. Sowohl bei der mikroskopisch gestützte Ermittlung der von den Bakterien belegten Oberfläche an einem Fluoreszenzmikroskop als auch die nachfolgende Ermittlung der prozentual von Bakterien belegten Fläche mittels Image J kann die dreidimensionale Beschichtung sowie die Fläche der unterschiedlichen Beschichtungsoberflächen nicht berücksichtigt werden.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Titan ist ein Standardmaterial für Implantate, welches sich durch eine sehr gute Biokompatibilität sowie vorteilhafte mechanische Eigenschaften auszeichnet. Weiterhin weist Titan ein gutes Korrosionsverhalten auf. Für die langfristige Verankerung des Implantats im Umgebungsgewebe ist die initiale Einheilphase direkt nach der Implantation enorm wichtig. Aus diesem Grund werden verschiedene Strategien entwickelt, die mit funktioneller Oberflächenbeschichtung der Metalloberfläche auf eine verbesserte Osseointegration des Implantats abzielen. Eine etablierte Methode stellen hierfür keramische Beschichtungen auf Titanoberflächen dar. Diese Beschichtungsmaterialien bestehen aus Kalziumphosphaten wie beispielsweise Brushit oder Hydroxylapatit, die zum natürlichen Knochen chemisch ähnlich sind. Eine Besonderheit des Brushits ist, dass diese Kalziumphosphatphase in physiologischer Umgebung einer Phasenumwandlung in schwerlösliche CPP bzw. der sukzessiven Degradation unterliegt.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die elektrochemisch gestützte Abscheidung (ECAD) von Kalziumphosphatschichten auf Titanoberflächen und gleichzeitige Einlagerung der bioaktiven Spurenelemente Kupfer und Strontium in die abgeschiedene Kalziumphosphatschicht. Durch die Freisetzung der bioaktiven Metallionen Strontium und Kupfer aus dieser Beschichtung soll die Einheilphase der Implantate verkürzt werden und insbesondere bei Patienten mit systemischen Erkrankungen oder schlechten Knochenlagern die Osseointegration unterstützen. Das Spurenelement Kupfer ist für den Prozess der Angiogenese sowie bei der Neubildung von Knochengewebe von großer Bedeutung. Weiterhin besitzt Kupfer ein antimikrobielles Potential, welches zur Vorbeugung von Infektionen von enormer Wichtigkeit ist. Durch die Integration von Strontium in die Kalziumphosphatphase Brushit soll sowohl die Inhibierung der Osteoklasten als auch die Stimulation der Präosteoklasten erzielt werden.

Die elektrochemisch gestützte Abscheidung (ECAD) von Brushit auf den Titanoberflächen mit integrierten Spurenelementen wurde durch Strontiumzugabe im Elektrolyten sowie hinsichtlich des Kupfers mit drei unterschiedlichen Beschichtungsstrategien erzielt: elektrochemische Abscheidung durch Kupferzugabe im Elektrolyten bzw. einer Kupferbasisschicht sowie der reine Adsorptionsprozess durch nachträgliche Kupferbadbehandlung einer bereits abgeschiedenen

Kalziumphosphatphase. Die Integration des Kupfers mit Kupferzugabe im Elektrolyten ist bereits eine etablierte Methode, allerdings sollte durch Modifizierung der Art und Weise der Kupferintegration eine andere Freisetzungskinetik angestrebt werden. Allerdings konnte sowohl mit adsorptiv gebundenem Kupfer an eine bereits abgeschiedene CPP als auch mit auf einer Kupferbasisschicht aufgelagerten CPP weder eine konstante Freisetzung annähernd nullter Ordnung noch eine 2-Schritt-Freisetzung erzielt werden. Mit hydrothormaler Behandlung der Beschichtungszustände mit Natriumhydroxid sollte der Einfluss der Umwandlung der abgeschiedenen Kalziumphosphatphase auf die Freisetzung der Spurenelemente untersucht werden. Es zeigte sich, dass infolge der NaOH-Behandlung das immobilisierte Kupfer in schwerlösliche Verbindungen fixiert wird und demzufolge wesentlich geringere freigesetzte Konzentrationen an Kupfer erzielt werden. Das antimikrobielle Potenzial des Kupfers wurde am Modellorganismus *Escherichia coli* SM 2029, GFP-gelabelt, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Adhäsion an den Beschichtungsflächen abhängig ist von der Zusammensetzung der Beschichtung. Bei den kupferhaltigen Beschichtungszuständen wurden nahezu keine adhärenen Bakterien detektiert.

Zusammenfassend konnten Erkenntnisse zur elektrochemisch gestützten Abscheidung von Kalziumphosphatphasen bei gleichzeitiger Einlagerung von biologisch aktiven Spurenelementen gewonnen werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Beschichtungsstrategien sollten diese in weiteren Untersuchungen soweit optimiert werden, dass auf den Titanoberflächen Belegungsdichten an Kupfer ungefähr in der gleichen Größenordnung abgeschieden werden. Weiterhin ist eine Modifizierung des Biofilmmediums notwendig, sodass in nachfolgenden Zellversuchen mit Serumproteinen gearbeitet werden kann. Um zu prüfen, inwieweit die *in vitro* Erkenntnisse dieser Forschungsarbeit auf *in vivo* Verhältnisse übertragbar sind, müssen nachfolgend Zellen beispielsweise Osteoklasten und Osteoblasten in die Versuchsdurchführung integriert sowie humanes Serum im Inkubationsmedium eingesetzt werden. Um die CPP-abhängige Freisetzungskinetik im Inkubationsverlauf optimieren zu können, ist die Charakterisierung der Beschichtungszustände beispielsweise mit XRD oder FTIR erforderlich. Weiterhin sollte für die Simulierung der biologischen Prozesse die Auslagerungsversuche der Beschichtungszustände über einen längeren Versuchszeitraum durchgeführt werden.

## 8 Summary and Outlook

Titanium is a standard material for implants, because of its very good biocompatibility and advantageous mechanical properties. Furthermore, titanium has a favorable corrosion behavior. For the long-term anchoring of the implant in the surrounding tissue, the initial healing phase is immensely important immediately after the implantation. For this reason, various strategies have been developed to improve the osseointegration of the implant by coating the metal surface with functional surface coating. An established method for this are ceramic coatings on titanium surfaces. These coating materials consist of calcium phosphates, such as brushite or hydroxyapatite, which are chemically similar to the natural bone. Because of the phase transformation into poorly soluble calcium phosphate phases (CPP) and the successive degradation in a physiological environment brushite came into the focus of recent research.

The aim of this study was to investigate the electrochemical assisted deposition (ECAD) of calcium phosphate layers on titanium surfaces and simultaneous deposition of the bioactive trace elements copper and strontium into the deposited calcium phosphate layer. The release of the bioactive metal ions strontium and copper from this coating should shorten the healing phase of the implants and, in particular, support the osseointegration in patients with systemic diseases or poor bone bearings. The trace element copper is of particular importance for the process of angiogenesis as well as for the new formation of bone tissue. Furthermore, copper has an antimicrobial potential, which is of great importance for the prevention of infections. By the integration of strontium into the calcium phosphate phase brushite strontium should be applied to inhibit the osteoclasts and to stimulate the preosteoclasts.

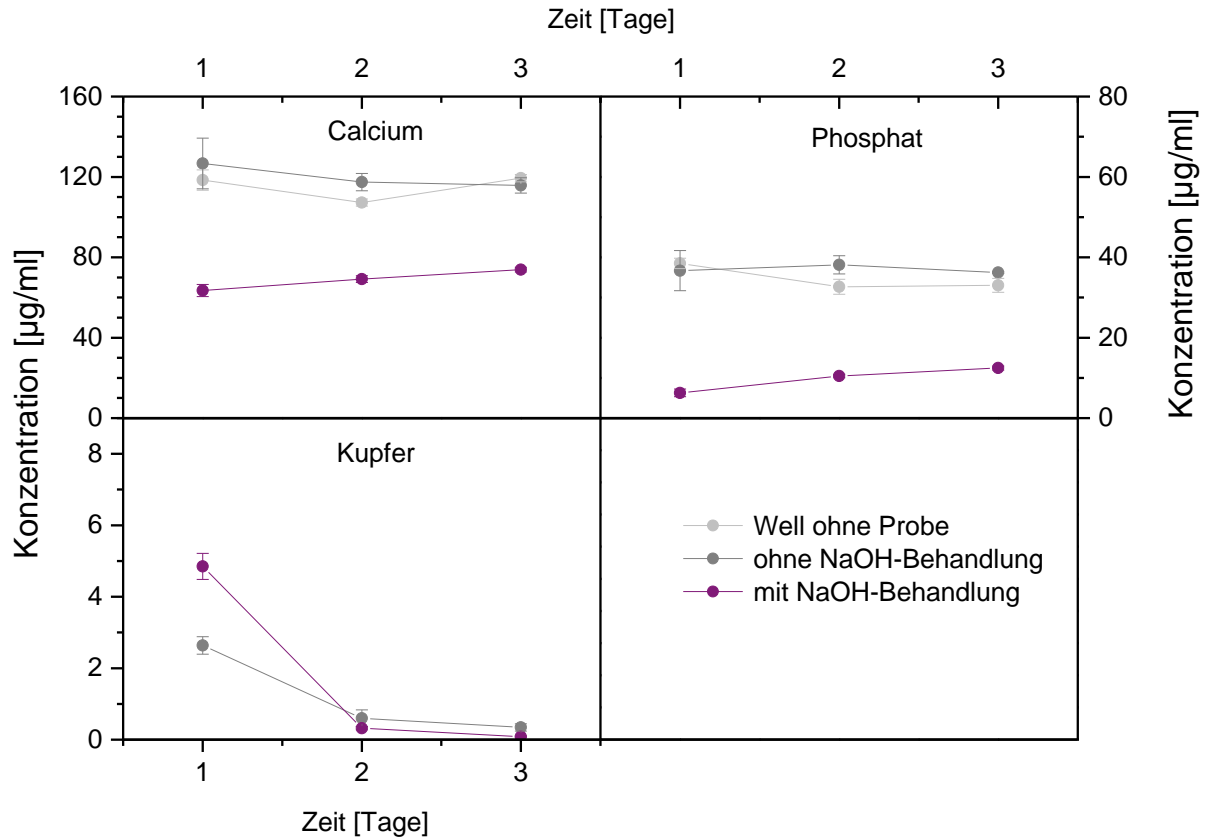
The electrochemical deposition (ECAD) of brushite on the titanium surfaces with integrated trace elements was achieved by electrochemical assisted deposition from electrolytes containing calcium, phosphate and strontium. Additionally, copper species could be integrated in CPP with three different coating strategies: electrochemical deposition by copper addition in electrolyte, a deposition of a copper base layer or the pure adsorption process by subsequent copper bath treatment of an already deposited CPP. The integration of copper from a copper-containing electrolyte is already an established method, but to modify the release kinetics of this integrated copper species from the coating surface the manner of copper integration should be

changed. However, as well as with adsorptive bound copper to an already deposited CPP as with CPP deposited on a copper base layer, neither a constant release of approximately zero-order nor a two-step release could be achieved. With hydrothermal treatment of the deposited coatings with sodium hydroxide, the influence of the conversion of the deposited CPP on the release of the trace elements should be investigated. As a result of the NaOH-treatment, the immobilized copper was fixed in difficultly soluble chemical compounds and, consequently, substantially lower released concentrations of copper were detected in the incubation medium. The antimicrobial potential of copper was investigated by the model organism *Escherichia coli* SM 2029, GFP-labeled. It was observed that the adhesive interaction of bacteria with the coating surface was dependent on the composition of the deposited coating. Compared with the strontium-containing coatings, no adherent bacteria on the copper-containing coatings were detected.

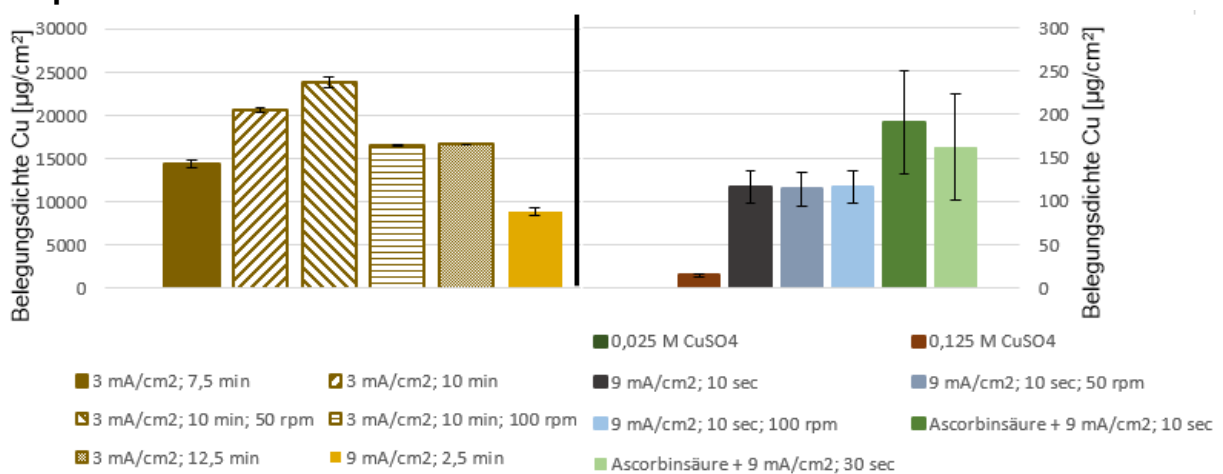
In summary, important insights into the electrochemically assisted deposition of calcium phosphate phases with simultaneous incorporation of biologically active trace elements were obtained. For a better comparability of the coating strategies, these results should be optimized in further investigations to such an extent that the amount of copper on the titanium surfaces is in the same order of magnitude. Furthermore, a modification of the biofilm medium is necessary so that serum proteins can be used in subsequent cell experiments. To test *the vitro* findings of this research work in an *in vivo* environment, cells, for example, osteoclasts and osteoblasts must be integrated into the experiment and human serum should be used in the incubation medium. To be able to optimize the CPP-dependent release kinetics in the process of incubation, the characterization of the deposited coating, for example with XRD or FTIR, are necessary. Furthermore, for the simulation of the biological processes, the study of release kinetics of the coatings should be performed over a longer experimental period



## Anhang

**Anhang 1 Freisetzungsverhalten für Co-Abscheidung Bruschit + 0,3 mM Cu, 1,5 mA/cm<sup>2</sup>, 3200 s ohne/mit NaOH-Behandlung**


**Abbildung 22 Freisetzungsverhalten des Probenzustandes Coabscheidung Bruschit mit 0,3 mM Kupfer**

**Anhang 2 Voruntersuchungen der Beschichtungszustände mit Kupferbasisschicht**


**Abbildung 23 Belegungsdichten an Kupfer in der Kupferbasisschicht in Abhängigkeit von Abscheidungsdauer, Stromdichte,**

### Konzentration der Kupfersulfatlösung sowie Drehzahl der Schüttelplatte

#### Anhang 3 Freigesetzte Kupfer- und Strontiummenge im serumhaltigen Inkubationsmedium

**Tabelle 13 Freisetungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Kupfers**

Zustand	Initial immobilisierte Kupfermenge [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	Kupfermenge nach Inkubation [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	Prozentuale Freisetzung der initial immobilisierten Kupfermenge am Tag 1	Prozentuale Freisetzung der initial immobilisierten Kupfermenge am Tag 2	Prozentuale Freisetzung der initial immobilisierten Kupfermenge am Tag 3
Bruskit / 20 mM Sr mit 0,5 mM Cu im Elektrolyten	113,05 $\pm$ 11,14	34,31 $\pm$ 13,37	ca. 89,5	ca. 23,2	0
Cu-Bad Bruskit -NaOH	50,95 $\pm$ 15,28	25,79 $\pm$ 4,77	ca. 50,2	ca. 5,1	ca. 0,5
Cu-Bad Bruskit / 20 mM Sr -NaOH	26,43 $\pm$ 5,73	7,96 $\pm$ 3,82	ca. 51,6	ca. 4,0	0
Cu-Bad Bruskit +NaOH	46,97 $\pm$ 0,47	30,73 $\pm$ 4,61	ca. 35,2	ca. 3,1	0
Cu-Bad Bruskit / 20 mM Sr +NaOH	22,77 $\pm$ 3,66	17,99 $\pm$ 0,47	ca. 32,3	ca. 4,8	3,8

Cu-Basis Bruskit -NaOH	2484,07 ± 445,86	222,92 ± 95,54	ca. 53,8	ca. 16,0	ca. 11,2
------------------------------	------------------------	----------------------	----------	----------	----------

**Tabelle 13 (Fortsetzung) Freisetungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Kupfers**

Cu-Basis Bruskit / 20 mM Sr -NaOH	1442,67 ± 200,63	557,32 ± 143,31	ca. 73,7	ca. 9,1	ca. 0,5
Cu-Basis Bruskit +NaOH	2802,54 ± 127,39	1656,05 ± 63,69	ca. 6,4	ca. 5,0	ca. 1,9
Cu-Basis/ Ascorbin- säure Bruskit +NaOH	3391,74 ± 429,93	2229,29 ± 95,54	ca. 22,0	ca. 8,4	ca. 3,8
Cu-Basis Bruskit / 20 mM Sr +NaOH	3184,71 ± 605,09	2292,99 ± 350,31	ca. 17,5	ca. 8,2	ca. 5,5

**Tabelle 14 Freisetungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Strontiums**

Zustand	Initial immobili- sierte Strontium- menge  [µg/cm <sup>2</sup> ]	Strontium- menge nach Inkubation  [µg/cm <sup>2</sup> ]	Prozentuale Freisetzung der initial immobili- sierten Strontium- menge am Tag 1	Prozentuale Freisetzung der initial immobili- sierten Strontium - menge am Tag 2	Prozentuale Freisetzung der initial immobili- sierten Strontium- menge am Tag 3
Bruskit / 20 mM Sr mit 0,5 mM Cu im Elektrolyten	32,10 ± 3,94	22,16 ± 1,40	ca. 77,4	ca. 13,2	ca. 10,9

Cu-Bad Bruskit / 20 mM Sr -NaOH	33,43 ± 1,97	17,57 ± 0,76	ca. 68,2	ca. 13,2	ca. 10,9
--	--------------------	--------------------	----------	----------	----------

**Tabelle 14 (Fortsetzung) Freisetungsverhalten der Beschichtungszustände hinsichtlich des Strontiums**

Cu-Bad Bruskit / 20 mM Sr +NaOH	37,77 ± 2,35	22,674 ± 1,01	ca. 26, 9	ca. 3,1	ca. 1,4
Cu-Basis Bruskit / 20 mM Sr -NaOH	47,01 ± 9,17	17,70 ± 3,18	ca. 29,5	ca. 9,7	ca. 5,3
Cu-Basis Bruskit / 20 mM Sr +NaOH	26,75 ± 1,14	16,24 ± 2,73	ca. 11,5	ca. 4,5	ca. 1,2

#### Anhang 4 Molare Ca/P - Verhältnisse der Beschichtungszustände nach dreitägiger Inkubation in serumhaltiger SBF

**Tabelle 15 Molare Ca/P-Verhältnisse nach Inkubation in serumhaltiger SBF**

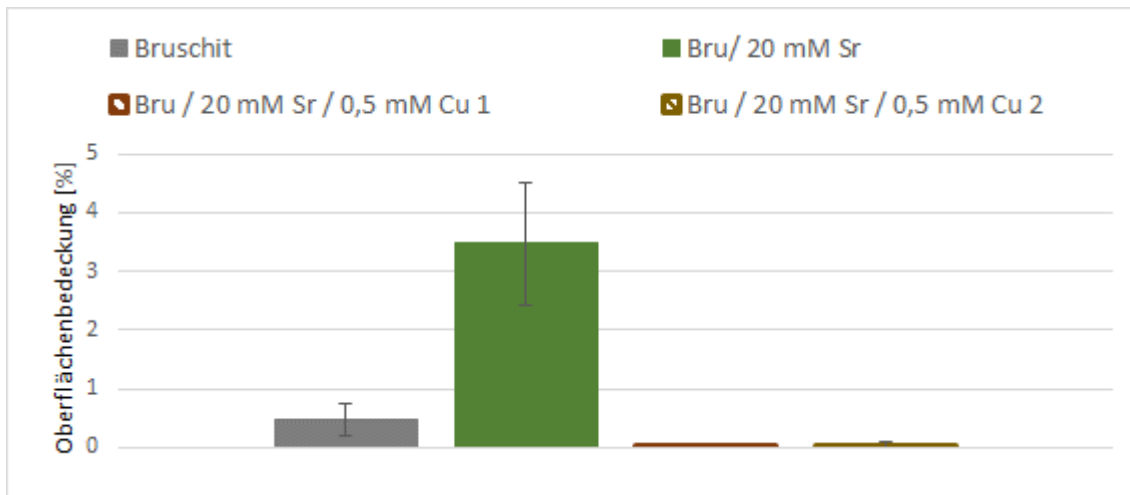
		Probe	Molares Ca/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis am Ende der Inkubation	Molares (Ca+Sr)/ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis	Molares (Ca+Cu)/ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Verhältnis
<b>Referenz 1</b>	<b>Ohne NaOH- Bad</b>	Bruskit	1,54 ± 0,02	-	-
<b>Referenz 2 Kupferzugabe ECAD</b>	<b>Ohne NaOH- Bad</b>	Bruskit / 20 mM Sr	0,88 ± 0,02	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,01

<b>Kupferbad-behandlung</b>	<b>Ohne NaOH-Bad</b>	Bruschit	$1,40 \pm 0,12$	-	$1,41 \pm 0,12$
		Bruschit / 20 mM Sr	$1,27 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,03$

**Tabelle 15 (Fortsetzung) Molare Ca/P-Verhältnisse nach Inkubation in serumhaltiger SBF**

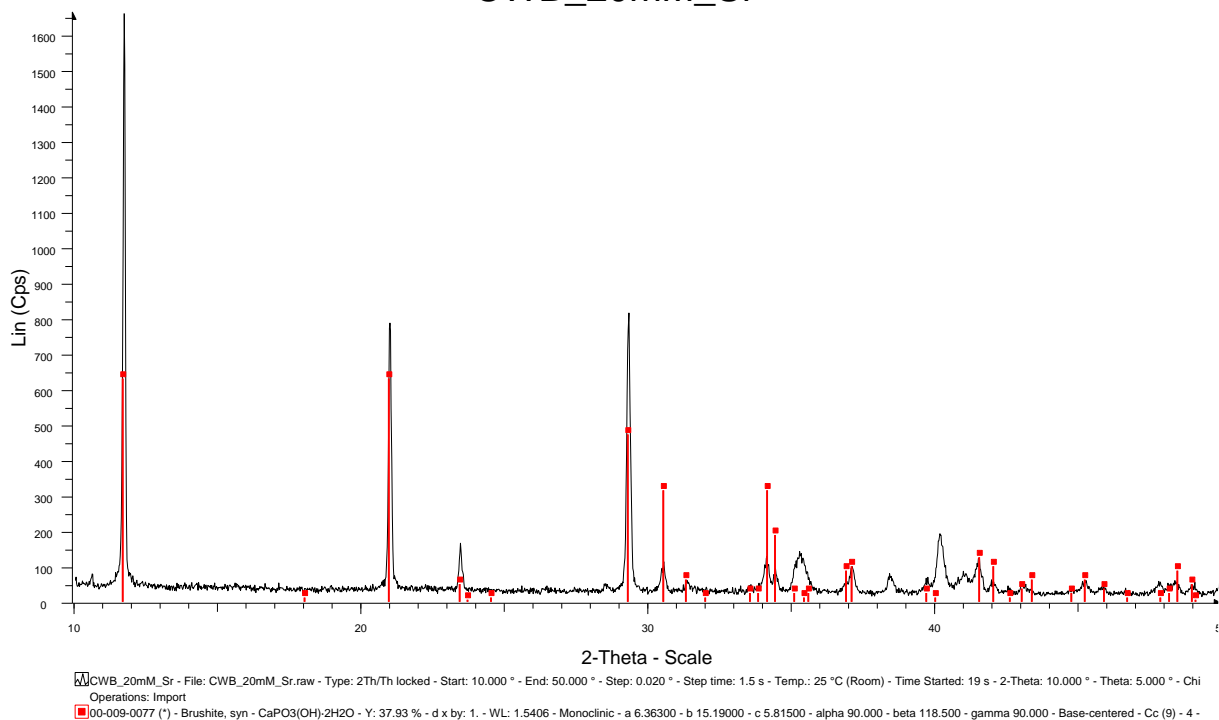
<b>Mit NaOH-Bad</b>	Bruschit	$1,52 \pm 0,04$	-	$1,54 \pm 0,04$
	Bruschit / 20 mM Sr	$1,38 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,03$
<b>Ohne NaOH-Bad</b>	Bruschit	$1,16 \pm 0,02$	-	n.a.
	Bruschit / 20 mM Sr	$0,92 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,03$	n.a.
<b>Mit NaOH-Bad</b>	Bruschit	$1,4 \pm 0,23$	-	n.a.
	Ascorbinsäure + Bruschit	$1,54 \pm 0,01$	-	n.a.
	Bruschit / 20 mM Sr	$0,93 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,04$	n.a.

**Anhang 5    Prozentual von Bakterien belegte Fläche mit einer Zellzahl von  $10^5$  Zellen/ml**



**Abbildung 24** Prozentual bedeckte Fläche der Beschichtungsoberflächen mit *E.coli* SM 2029 nach 17-stündiger Inkubation im Biofilmmedium nach Inokulation von  $2 \cdot 10^5$  Zellen

#### Anhang 6 Untersuchung mittels Röntgendiffraktion CWB\_20mM\_Sr



**Abbildung 25** Diffraktogramm von Co-Abscheidung Bruschat mit 20 mM Sr

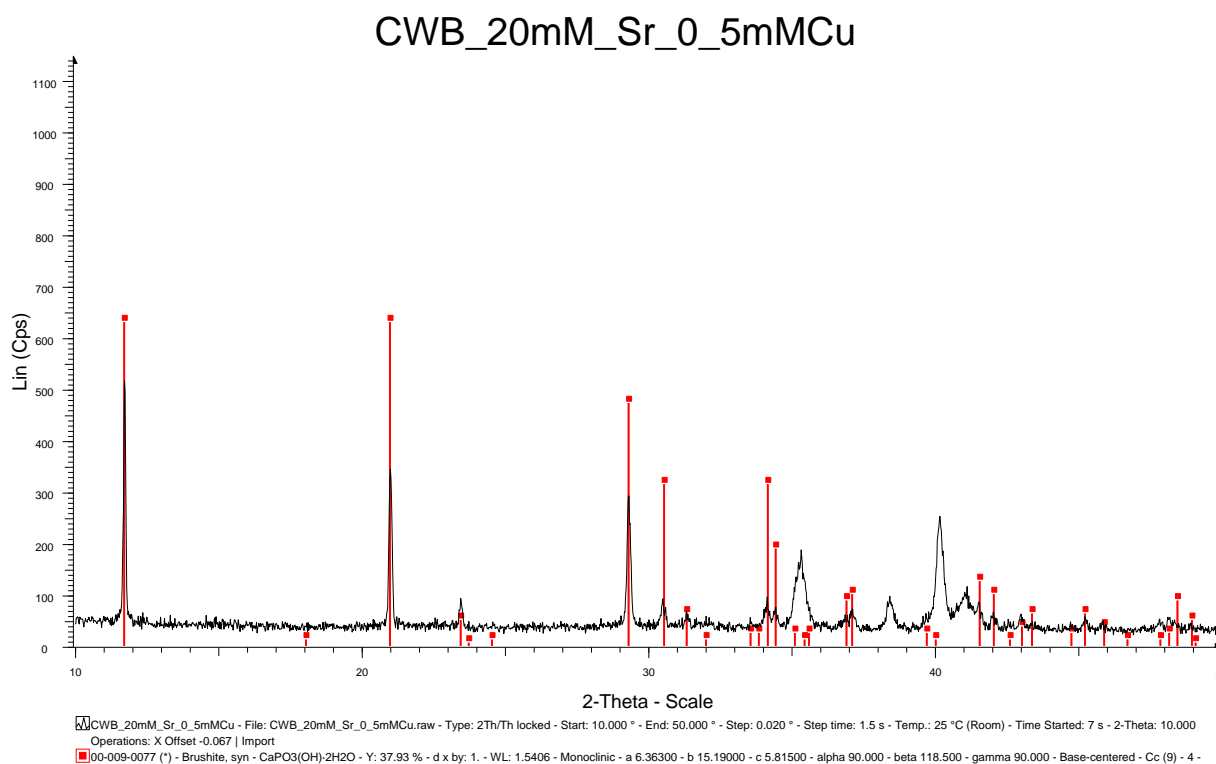


Abbildung 26

Diffraktogramm von Co-Abscheidung Brushit mit 20 mM Sr  
sowie 0,5 mM Cu

## Literaturverzeichnis

Bastidas J.M., Mora N., Cano E., Polo J.L. (2001). Characterization of copper corrosion products originated in simulated uterine fluids and on packaged intrauterine devices. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE, 12 (5): 391-397

Biesinger Mark C., Lau Leo W.M., Gerson Andrea R., Smart Roger St. C. (2010). Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. Applied Surface Science, 257:887-898

Boanini E., Gazzano M., Bigi A. (2009). Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. Acta Biomaterialia, 6 (6):1882-1894

Bose S., Fielding G., Tarafder S., Bandyopadhyay A. (2013). Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. Trend Biotechnology, 31 (10): 594-605

Cano E., Torres C.L., Bastidas J.M. (2001). An XPS study of copper corrosion originated by formic acid vapor at 40 % and 80 % relative humidity. Materials and Corrosion, 52 (9): 667-676

Choudhary S., P. Halbout, Alander C., Raisz L., Pilbeam C. (2007). Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. Journal of Bone and Mineral Research, 22 (7): 1002-1010

Chusuei C.C., Brookshier M.A., Goodman D.W. (1999). Correlation of Relative X-ray Photoelectron Spectroscopy Shake-up Intensity with CuO Particle Size, American Chemical Society, 15 (8): 2806-2808

Cudennec Yannick und André Lecerf (2013). The transformation of Cu(OH)<sub>2</sub> into Cu<sub>2</sub>O, revisited. Solid State Science, 5 (11-12): 1471-1474

Epple, Matthias. (2003): Biomaterialien und Biomineralisation. Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. 1.Aufl.: Verlag Teubner-Verlag S.62-68

Fleet Michael E., Liu Xiaoyang, King Penelope L. (2004). Accommodation of the carbonate ion in apatite: An FTIR and X-ray structure study of crystals synthesized at 2-4 GPa. , American Mineralogist, 89 (10): 1422-1432

Frost L. Ray, Klopogge Theo, Williams Peter A., Martens Wayde, Johnson Therese E., Leverett Peter (2002). Vibrational spectroscopy of the basic copper phosphate minerals: pseudomalachite, ludjibaite and reichenbachite, Spectrochimica, Acta Part A, 58 (13): 2861-2868



Grass Gregor, Rensing Christopher, Solisz Marc (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface, American Society for Microbiology, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 77 (5): 1541-1547

Hamidi A.El., Mulongo Masamba R., Khachani M. Halim M., Arsalane S. (2016). Kinetic modeling in liquid phase sorption of copper ions on brushite di-calcium phosphate di-hydrate  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (DCPD), Desalination and Water Treatment, 56 (3): 779-791

Hernandez J., Wrschka P., Oehrlein G.S. (2001). Surface Chemistry Studies of Copper Chemical Mechanical Planarization. Journal of the Electrochemical Society, 148 (7): 389-397

Huang, Yong et al. (2015). Osteoblastic cell responses and antibacterial efficacy of Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using electrodeposition method. Royal Society of Chemistry, 5 (22): 17076-17086

Juhasz A. Judith, Best Serena M., Auffret Antony D., Bonfield William (2008). Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum, Journal of Materials Science, 19 (4):1823-1829

Klammert U., Ignatuis A., Wolfram U., Reuther T., Gbureck U. (2011). In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. Acta Biomaterialia, 7 (9): 3469-3475

Krönung, Mariusz (2008). Untersuchungen zum Abbindeverhalten und den mechanischen Eigenschaften von Brushit-bildenden mineralischen Knochenzementen. S. 85 Würzburg, Julius-Maximilians-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation: S. 6 - 8

Liu Jie, Fangbing Li, Liu Cong, Wang Hongying, Ren Baoriui, Yang Ke, Zhang Erlin (2014). Effect of Cu content on the antibacterial activity of titanium–copper sintered alloys. Materials Science and Engineering C1 (35): 392-400

MacNevin David Earl (2005). The Effects of phosphate roughness and copper release in water distribution systems. S.154 Orlando, College of Engineering and Computer Science at the University of Central Florida, Dissertation: S. 94 - 95

Madsen H.E. (1975). Heterogeneous Nucleation of Calcium Phosphates. II. Inhibition by Cupric Ions. Acta Chemica Scandinavica A. 3 (29a): 277-281

Madsen H.E. (2008). Influence of foreign metal ions on crystal growth and morphology of brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and its transformation to octacalcium phosphate and apatite. Journal of Crystal Growth, 310 (10): 2602-2612

Marie J.P. , Felsenberg D., Brandi M.L. (2001). How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. Osteoporosis International, 22 (6): 1659-1667

Marie P.J. (2010). The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. Bone, 46 (3): 571-576

Magagnin L., Maboudian R., Carraro C. (2001). Selective Deposition of thin copper films onto silicon with improved adhesion. Advancing solid state and electrochemical science and technology. Electrochemical and Solid - State Letters, 4(1): C5-C7

Matusiewicz H. (2014). Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ion to nanoparticles-A systematic analytical review. Acta Biomaterialia, 10 (6): 2379-2403

Mulansky S., Ruhnow M., Lenk F. Goering P., Bley Th. Boschke E. (2015). Biomimetic and bioinspired anti-adhesive and antimicrobial surfaces, Proceedings of International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning, June 07-12, 2015, Enfield (Dublin) Ireland

Nielsen, S.Pors. (2004).The biological role of strontium. Bone, 35 (3):583-588.

Noyama Y., Miura T., Ishimoto T., Niinomi, M, Nakano T. (2012). Bone Loss and Reduced Bone Quality of the Human Femur after Total Hip Arthroplasty under Stress-Shielding Effects by Titanium-Based Implant. Materials Transactions, 53 (3):565-570.

Ni Ming und Buddy D. Ratner (2008). Differentiation of Calcium Carbonate Polymorphs by Surface Analysis Techniques—An XPS and TOF-SIMS study. Surface and Interface Analysis, 40 (10):1356-1361

Pan H., Yi J.B., Shen L. (2007). Room-Temperature Ferromagnetism in Carbon-Doped ZnO. The American Physical Society. PHYSICAL REVIEW LETTERS. 99 (12): 127201-1-127201-3

Peters, Klaus M.; König, Dietmar P. (2008): Fortbildung Osteologie 2. 1.Aufl.: Verlag: Steinkopff-Verlag: S:110

Peters, Fabian (2001). Biologische Kristallisation von Calciumphosphaten-Untersuchungen und Simulation, S. 277, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Dissertation, S. 21-25

Pleshko Nancy, Boskey Adele, Mendelsohn Richard (1991). Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. Biophysical Journal, 60 (4): 786-793

Roessler S., Sewing A., Stölzel M., Born R., Scharnweber D., Dard M., Worch H., (2002). Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature. Journal of Biomedical Material Research. 64 (4): 655-663

Ropp Richard C. (2012): Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds. 1.Aufl.: Verlag: Elsevier: S.255-256

Rosa Silvia, Madsen Hans E. (2010) Influence of some foreign metal ions on crystal growth kinetics of brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Journal of Crystal Growth 312 (20): 2983-2988

Rokita E, Hermes C., Nolting H.-F., Ryczek J. (1993). Substitution of calcium by strontium within selected calcium phosphates. *Journal of Crystal Growth*. 130 (3): 543-552

Scharnweber, Dieter; Bierbaum, Susanne (2009): Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. 1.Aufl.: Verlag: Springer-Verlag: S. 215-263

Schumacher Michael, Gelinsky, Matthias; (2015). Strontium modified calcium phosphate cements - approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *Journal of Materials Chemistry B*.3 (23): 4626-4640

Schumacher, Matthias (2014) Entwicklung und Charakterisierung Strontium-modifizierter CaP-Knochenzemente zur Behandlung osteoporotischer Knochendefekte. S. 154, Dresden, Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen, Dissertation, S. 13-18

Shadanbabaz S., Dias G.J. (2012). Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 8 (1): 20-30

Sheik Z., Zhang L.Y., Grover L., Merle G.E. , Tamimi F., Barrelet J. (2015). In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts. *Acta Biomaterialia*, 26: 338-346

Sterritt, R., Lester J. (1980). Interactions of heavy metals with bacteria. *Science of the total Environment*, 14 (1): 5-17

Stulajterova R. und L. Medvecký (2007). Effect of calcium ions on transformation brushite to hydroxyapatite in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 316 (1-3): 104-109

Tas, A.Cüneyt (2000). Synthesis of biomimetic Ca hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21 (14): 1429-1438

Tas A.Cüneyt und Sarit B. Bhaduri (2004). Chemical Processing of  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Its conversion to Hydroxyapatite. *Journal of Ceramic Society*, 87 (12): 2195-2200

Thurman, R.B., Gerba, C.P. (1989). The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Critical Review in Environmental Control*, 18 (4): 295-315

Young V. und Otagawa T (1984) XPS-Studies on strontium compounds. *Application of Surface Science*. 20 (3) 228-248

Warzen, R.M., Currey, J.A., Guo, H., Brunski, J.B., Helms, J.A., Nanci A. (2013). Micromotion-induced strain fields influence early stages of repair at bone-implant interfaces. *Acta Biomaterialia*. 9: 6663-6674

Wolf-Brandstetter, Cornelia, Oswald , Steffen, Bierbaum Susanne, Wiesmann Hans-Peter (2013). Influence of pulse ratio on codeposition of copper species with calcium phosphate coatings on titanium by means of electrochemically assisted deposition. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. 102B (1): 160-172

Wu C., Zhou Y., Xu M., Han P., Chen L., Chang J. (2013). Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity osteostimulation antibacterial activity. *Biomaterials*. 34 (2): 422-433

Xie Jing, Riley Clyde, Kumar Mukesh, Chittur Krishnan (2002). FTIR/ATR Study of protein adsorption and brushite transformation to hydroxyapatite. *Biomaterials*. 23: 3609-3616

Zhang J., Barbieri D., Hoopen H. ten, de Bruijn J. D., van Bkitterswijk C.A, Yuan H. (2015). Microporous calcium phosphate ceramics driving osteogenesis through surface architecture. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 103 (3): 1188-1199

URL-1 (10.11.2016) Torsten Purle, [info@steine-und-minerale.de](mailto:info@steine-und-minerale.de): Steine und Minerale. URL: <http://www.steine-und-minerale.de/artikel.php?topic=2&ID=35>

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Biomaterial-Entwicklung am Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien des Instituts für Werkstoffwissenschaft an der Technischen Universität Dresden angefertigt.

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Radehaus und dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. habil. Dieter Scharnweber für die Betreuung meiner Masterarbeit vonseiten der Hochschule Mittweida sowie der Technischen Universität Dresden bedanken.

Mein Dank gilt Frau Dr. Cornelia Wolf-Brandstetter für die aufschlussreichen Diskussionen, ihre kompetente Betreuung sowie die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Heike Zimmermann und Herrn Dr. René Beutner für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, 2016

Stefanie Urbanek